

Universität Zürich
Anatomisches Institut

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. Nat. Oliver Ullrich

Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. med. Dr. rer. Nat. Oliver Ullrich

**Der Einfluss simulierter Mikrogravitation auf die
Regulation von Zellzyklusproteinen humaner
monozytärer Zellen am Modellsystem U937**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Laura Maria Roose
von Zürich ZH

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. med. Dr. rer. Nat. Oliver Ullrich
Zürich 2014

Inhaltsverzeichnis

| | |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Zusammenfassung | 1 |
| 2. Einleitung | 3 |
| 2.1 Das menschliche Immunsystem | 3 |
| 2.2 Das Monozyten Makrophagen System | 3 |
| 2.2.1 Monozyten und Makrophagen | 3 |
| 2.2.2 Signaltransduktion | 6 |
| 2.2.2.1 c-Jun | 6 |
| 2.2.2.2 Vimentin | 7 |
| 2.2.2.3 c-Myc | 8 |
| 2.3 Das Modellsystem | 10 |
| 2.3.1 Die Zelllinie U937 | 10 |
| 2.3.2 Myeloisches Differenzierungsmodell | 10 |
| 2.4 Die Schwerkraft | 12 |
| 2.5 Der Einfluss von Schwerelosigkeit auf den menschlichen Körper | 13 |
| 2.5.1 Allgemeine Veränderungen | 13 |
| 2.5.2 Veränderungen des Immunsystems | 14 |
| 2.5.3 Veränderungen des Monozyten-Makrophagen-Systems | 15 |
| 2.6 Modellsysteme für die Erzeugung von Schwerelosigkeit | 16 |
| 2.7 Der 2D-Klinostat | 19 |
| 3. Fragestellung | 20 |
| 4. Material und Methoden | 21 |
| 4.1 Material | 21 |
| 4.1.1 Zellen | 21 |
| 4.1.2 Chemikalien | 21 |
| 4.1.2.1 Lösungen | 21 |
| 4.1.2.2 Antikörper | 26 |
| 4.1.2.2.1 Primärantikörper | 26 |
| 4.1.2.2.2 Sekundärantikörper | 26 |
| 4.1.3 Geräte | 27 |
| 4.2 Methoden | 29 |
| 4.2.1 Zellkultur | 29 |
| 4.2.2 Klinorotation | 29 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 4.2.3 Western Blot | |
| 4.2.3.1 Zelllyse | 30 |
| 4.2.3.2 Proteinbestimmung | 31 |
| 4.2.3.3 Gelelektrophorese | 31 |
| 4.2.3.4 Western Blot | 32 |
| 4.2.3.5 Gelfärbung | 32 |
| 4.2.3.6 Antikörperfärbung | 33 |
| 4.2.3.7 Digitalisierung | 33 |
| 4.2.4 Statistik | 34 |
| 5. Ergebnisse | 34 |
| 5.1 Vitalitätstests | 35 |
| 5.1.1 Vitalität der U937 Zellen nach 24 Stunden Klinorotation | 35 |
| 5.1.2 Vitalität der U937 Zellen nach 48 Stunden Klinorotation | 35 |
| 5.1.3 Vitalität der U937 Zellen nach 72 Stunden Klinorotation | 36 |
| 5.2 Zahl und Vitalität von U937 Zellen nach 24 bis 72 Stunden Klinorotation | 38 39 |
| 5.2.1 24 Stunden Klinorotation unstimulierter Zellen | |
| 5.2.2 48 Stunden Klinorotation unstimulierter Zellen | 39 |
| 5.2.3 72 Stunden Klinorotation unstimulierter Zellen | 40 |
| 5.2.4 72 Stunden Klinorotation stimulierter Zellen | 40 |
| 5.3 Die Expression von Differenzierungsmarkern nach Klinorotation | 41 |
| 5.3.1 c-Jun | 43 |
| 5.3.2 Vimentin | 43 |
| 5.3.3 c-Myc | 44 |
| 6. Diskussion | 47 |
| 7. Literaturverzeichnis | 50 |
| 8. Danksagung | 59 |
| 9. Curriculum vitae | 64 |
| | 65 |

1. Zusammenfassung

Seit längerem ist bekannt, dass der Wegfall der Gravitationskraft der Erde zu Veränderungen in verschiedenen menschlichen Funktionssystemen führt. Folgen sind unter anderem eine verminderte Immunabwehr, Knochendemineralisierung, Muskelatrophie, kardiovaskuläre Dekonditionierung und orthostatische Intoleranz. Es wurden bereits für verschiedene Zellen des Immunsystems Mikrogravitations-induzierte Veränderungen ihrer Zahl und Funktion beschrieben. Auch über die Reaktion des Monozyten-Makrophagen-Systems als Teil des innate Immunsystems wurden bisher mehrere Studien veröffentlicht. Es wurde unter Anderem ein Anstieg der Monozyten nach kürzeren Raumflügen beobachtet, welcher nach Missionen länger als 6 bis 9 Tage nicht mehr zu beobachten war. Auch die Phagozytose-Aktivität, Oxidative Burst Kapazität und durch Fc-Rezeptor-Bindung induzierte Degranulation als wichtige Funktionen der Monozyten erwiesen sich als eingeschränkt bei Astronauten im Vergleich mit einer Kontrollgruppe. Bezüglich molekularer Veränderungen konnte eine verminderte Expression von Bestandteilen des Fc γ -Rezeptors sowie des TLR4 (Toll-like Receptor) direkt nach Raumfahrtmissionen nachgewiesen werden. Beide Moleküle spielen eine grundlegende Rolle in der Internalisation von Bakterien, der Fc γ -Rezeptor über die Bindung von Immunglobulinen, mit welchen Bakterien opsonisiert werden, der TLR4 durch die Interaktion mit dem bakteriellen Oberflächenmolekül LPS (Lipopolysaccharid).

Um den Einfluss von Mikrogravitation auf das Monozyten-Makrophagen-System weiter zu klären, wurden monozytäre Zellen der Tumorzelllinie U937 mit und ohne Differenzierungs-Stimulation für 24 bis 72 Stunden simulierter Mikrogravitation ausgesetzt und danach mit Kontrollproben, welche unter den gleichen Bedingungen bei normaler Schwerkraft inkubiert wurden, verglichen. Untersucht wurden Veränderungen bezüglich der Zahl und Differenzierungsfähigkeit der monozytären Zellen wie auch die Expression wichtiger molekularer Differenzierungsmarker.

Die Mikrogravitation wurde mithilfe eines Klinostaten simuliert. Dieser rotiert die suspenten Zellen mit einer konstanten Drehzahl, so dass intrazelluläre Partikel nicht sedimentieren können, sondern homogen verteilt werden und der Gravitationsvektor durch einen omnilateralen Vektor ersetzt wird.

Vor den eigentlichen Experimenten musste die optimale Zellzahl pro Milliliter für die unterschiedlichen Versuchszeiten ermittelt werden. Es ergab sich ein Optimum der Zellvitalität bei 2×10^6 Zellen/ml für 24 und 1×10^6 Zellen/ml für 48 und 72 Stunden Klinorotation. Die Zahl und Vitalität der Zellen wurden mittels Trypanblau-Färbung ermittelt. Die Analyse der Klinostaten-Versuche ergab bei unstimulierten Monozyten über alle Experimentzeiten einen höheren Zellgehalt in den klinorotierten Zellen verglichen mit den Kontrollen. Dies könnte einerseits durch die bei konstanter Rotation und somit verhinderter Sedimentation der Zellen innerhalb der Pipette geringere Kontaktinhibierung der Zellen bedingt sein. Andererseits fiel auch nach Raumfahrtmissionen ein, wenige Tage andauernder Anstieg der Monozytenzahl auf, was somit für einen tatsächlichen Mikrogravitations-Effekt sprechen könnte. Die Auswertung der Versuche mit stimulierten Zellen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen 1g und μ g bezüglich der Zellzahl oder –Adhärenz. Signifikant war die tiefere Zellvitalität bei adhären, verglichen mit suspenten Zellen. Dieser Unterschied könnte sowohl durch die proapoptotische Partialwirkung von PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) wie auch durch eine vermehrte Trypanblau-Aufnahme in differenzierte und somit adhären monozytäre Zellen bedingt sein.

Die Expression von drei wichtigen Differenzierungsmarkern wurde mittels Immunoblot analysiert. Es zeigte sich eine mit steigender Expositionszeit abnehmende und durch Stimulation zunehmende c-Jun-Expression. Ausserdem fiel ein tieferes c-Jun in den klinorotierten Proben verglichen mit den Kontrollen auf. Dasselbe Bild zeigte die Analyse der Vimentin-Expression. c-Jun ist als Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1 an der Regulation von Genen der Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt. Vimentin, ein Intermediärfilament, gilt als Marker der myeloischen Zelldifferenzierung und dient der Stabilität der Zellen bei mechanischen Belastungen. c-Myc, ebenfalls Bestandteil eines Transkriptionsfaktors, reguliert unter anderem die Expression von Genen der Zellproliferation und -Differenzierung und gilt als inverser Differenzierungsmarker. Trotzdem kam es durch die Inkubation mit PMA zu einem signifikanten Anstieg von c-Myc. Das höhere c-Myc in den μ g-Gruppen verglichen mit den 1g-Kontrollen bei stimulierten Zellen ist jedoch wieder gleichsinnig mit den Veränderungen, welche in der Analyse der c-Jun- und Vimentin-Expression aufgefallen waren. Diese Resultate legen eine Mikrogravitations-induzierte Differenzierungshemmung der monozytären Zellen nahe.

2. Einleitung

2.1 Das menschliche Immunsystem

Das Immunsystem gliedert sich in zwei Teile, einen innaten oder angeborenen und einen adaptiven oder erworbenen Teil.

Das angeborene Immunsystem garantiert ein rasches Erkennen und Eliminieren von Erregern, dies allerdings unspezifisch und ohne einen Langzeitschutz zu generieren. Zu diesem Arm gehören neben mechanischen Barrieren die Monozyten, die Makrophagen, das Komplementsystem, die dendritischen Zellen, die neutrophilen, wie auch die basophilen und eosinophilen Granulozyten. Durch die Bindung bestimmter Rezeptoren reagieren diese Zellen auf pathogene Keime.

Auf der anderen Seite reagieren die evolutionsgeschichtlich jüngeren Zellen des erworbenen Immunsystems hoch spezifisch und bilden hierbei Gedächtniszellen, was bei einer erneuten Infektion eine weitaus raschere und effizientere Abwehr ermöglicht. Zu ihnen gehören die T- und B-Lymphozyten, sowie die Antigen-präsentierenden Zellen.^{1; 2}

Beide Teile des Immunsystems erkennen körpereigenes Gewebe und greifen ausschliesslich fremde Organismen wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten an. Ist diese Unterscheidung gestört, können sich Autoimmun-Erkrankungen entwickeln, wobei sich die Abwehrreaktion gegen körpereigene Zellen richtet. Beispiele für diese Art von Erkrankungen sind unter anderem systemischer Lupus erythematodes, rheumatoide Arthritis und Multiple Sklerose.¹

2.2 Das Monozyten Makrophagen System

2.2.1 Monozyten und Makrophagen

Monozyten stammen von multipotenten Stammzellen im Knochenmark ab. Sie zirkulieren als Progenitorzellen im Blut und migrieren zufällig oder im Falle einer Entzündung mediatorinduziert ins Gewebe, wo sie zu Makrophagen differenzieren.³ Besonders zahlreich kommen Makrophagen in den Organen vor, in denen die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Erregern besonders hoch ist, wie dem Respirations- und Gastrointestinaltrakt.²

Eine wichtige Rolle spielen Vertreter des MPS (mononukleäres Phagozytensystem) auch in der Haut, der Milz und der Leber. Je nach Organ tragen die von Monozyten

abstammenden MPS-Zellen unterschiedliche Namen, wie zum Beispiel Alveolarmakrophagen in den Lungen oder Kupffer-Sternzellen in der Leber.³

Die Zellen des mononukleären Phagozytensystems spielen eine duale Rolle in der Immunabwehr. Als Mitglieder des innaten Immunsystems sind Makrophagen neben neutrophilen Granulozyten die wichtigsten zur Phagozytose befähigten Zellen des menschlichen Immunsystems. Sie identifizieren und eliminieren körperfremde Organismen durch Internalisation.⁴

Des Weiteren sind Monozyten und auch Makrophagen durch ihre Funktion als antigenpräsentierende Zellen von grundlegender Bedeutung für das adaptative Immunsystem. Die phagozytierten Erreger werden prozessiert und ihre Antigene auf der Zelloberfläche präsentiert. Hierdurch, wie auch durch die Produktion von Interleukinen, werden T-Zellen aktiviert. Nur durch diese beiden Mechanismen ist eine komplette T-Zellaktivierung möglich.⁵

Ein Sonderfall stellen die Langerhanszellen der Epidermis der Haut dar. Sie phagozytieren wie andere Makrophagen eindringende Keime. Nach der Internalisierung wandern sie allerdings zu lokalen Lymphknoten, wo sie die prozessierten Antigene den Lymphozyten präsentieren und diese aktivieren.² Die Funktionen der Monozyten und Makrophagen bestehen aus der Phagozytose, dem Oxidative Burst, der Antigen- Präsentation und der Zytokinproduktion.² Die Phagozytose läuft Rezeptorvermittelt ab. Die verschiedenen auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren, wie zum Beispiel TLR (Toll-like receptor) und Fc-Rezeptor binden wie in Abbildung 1 dargestellt bestimmte Antigene von Viren, Bakterien und Pilzen wie zum Beispiel LPS (Lipopolysaccharide), das Oberflächen-Molekül von gramnegativen Bakterien, oder das Fc-Fragment von Immunglobulinen. Somit können nicht nur mit Antikörpern opsonierte, sondern auch nicht-markierte Erreger eliminiert werden.²



Abb. 1: Funktionsprinzip des CD14-TLR4 Komplexes und des Fc-Rezeptors, der mit Antikörpern markierte Erreger bindet.

Wird ein Rezeptor durch den entsprechenden Liganden gebunden, wird die Phagozytose eingeleitet und der Keim durch die Umhüllung mit Zellmembran internalisiert. Das bei der Phagozytose entstandene Phagosom verschmilzt im Makrophagen-Inneren mit einem Lysosom und bildet so das Phagolysosom. Die Freisetzung der im Lysosom enthaltenen sauren Hydrolase, Defensine und toxischen Sauerstoffverbindungen wird Oxiadative Burst genannt und führt zu der Zerstörung des phagozytierten Erregers.

Die hierbei entstandenen Antigene können nun auf der Zelloberfläche präsentiert werden.² Die Makrophagen können den toxischen Lysosomen-Inhalt auch sezernieren und so die Erreger direkt angreifen, welche für die Phagozytose zu gross sind, wie zum Beispiel Parasiten.² Ausserdem phagozytieren Makrophagen auch körpereigene Zellen, wenn diese lädiert, alt oder apoptotisch sind.² Dies beugt unter anderem der Entstehung von Tumoren vor. Anders als die neutrophilen Granulozyten gehen die Makrophagen durch die Phagozytose nicht zwingend zu Grunde, sondern nur, wenn die phagozytierte Last zu gross ist.²

Gesteuert wird die Funktion und Reifung der Makrophagen und ihrer Vorläufer durch ein komplexes System intrazellulärer Signalwege, welche durch äussere Faktoren modifiziert werden. Unter anderen spielen hierbei die Proteine c-Jun, Vimentin und c-Myc eine entscheidende Rolle.

2.2.2 Signaltransduktion

2.2.2.1 c-Jun

Die intrazelluläre Bedeutung von c-Jun gründet auf seiner Funktion als Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1 (Activating Protein 1). AP-1 besteht entweder aus Heterodimeren von Jun-, Fos-, und ATF-Molekülen oder aus Jun-Homodimeren.⁶ Es kontrolliert sowohl die basale, wie auch die induzierbare Transkription bestimmter Gene.⁷ Bei den regulierten Genen handelt es sich um TREs (TPA-responsive element, TPA = 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat oder PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat) und CREs (cAMP-responsive element, cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat). Diese Gene regulieren unter anderem die Proliferation von Fibroblasten, die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und die Apoptose.⁶ Reguliert werden diese Gene durch den PKC-Signalweg (Protein-Kinase C). Die PKC wird durch Wachstumsfaktoren und Differenzierungsinduktoren wie PMA stimuliert und führt unter anderem AP-1-abhängig zu einer Transkriptionssteigerung der korrespondierenden Gene.⁷ Extrazelluläre Stimuli, wie UV-Strahlung, Zytokine und Wachstumsfaktoren, regulieren sowohl die c-Jun-Transkription, wie auch dessen Stabilität durch die Aktivität der JNK (Jun-N-terminale-Kinase). Die aktivierte JNK phosphoryliert wie in Abbildung 2 dargestellt c-Jun an den Serinresten 63 und 73. Dies erhöht die Stabilität von c-Jun und schützt es vor der ubiquitinabhängigen Proteolyse durch das Proteasom.⁶ Zusammengefasst führt c-Jun zu einer Zellzyklusbeschleunigung durch eine kürzere G1-Phase sowie zu einer Apoptose-Hemmung.

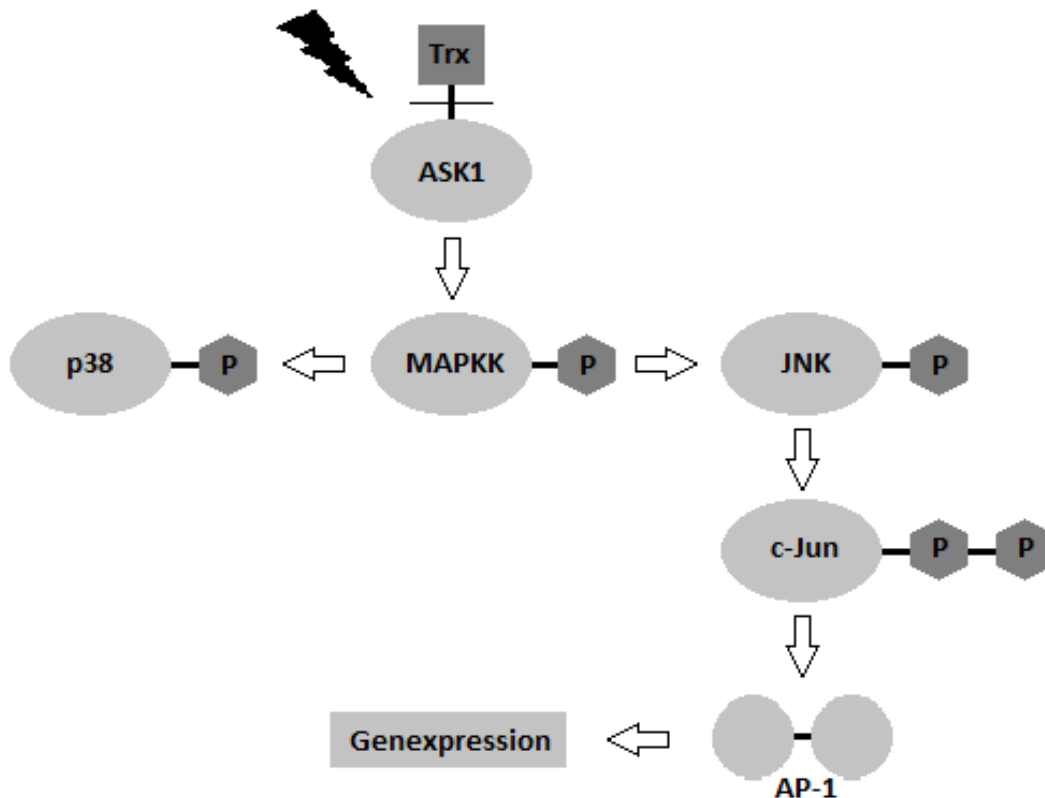


Abb. 2: Schematische Darstellung der c-Jun-Aktivierung und –Wirkung. Stimuli, wie Zytokine, UV-Strahlung und oxidativer Stress, führen zu einer Aktivierung der ASK1 (Apoptosis Signal Regulating Kinase 1) durch die Abspaltung von Trx (Thioredoxin). Die ASK1 phosphoryliert (P) und aktiviert so MAPKK (MAP-Kinase Kinase). Diese wiederum aktivieren unter anderem die MAP-Kinase (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase) JNK. Die JNK phosphoryliert c-Jun zweifach: An Serin 63 und 73, was zu einer Steigerung der Stabilität und Aktivität von c-Jun führt.

2.2.2.2 Vimentin

Zytoskelett-Filamente kommen in eukaryotischen Zellen in drei Formen vor:

- Aktinfilamente ermöglichen eine stabile Zellform, sowie die Migration von Zellen
- Mikrotubuli leiten den intrazellulären Transport
- Intermediärfilamente, zu welchen Vimentin gehört, dienen vor allem der Stabilität und Widerstandsfähigkeit von mechanisch belasteten Zellen.

Anders als Aktinfilamente und Mikrotubuli kommen Intermediärfilamente weder bei allen Eukaryoten noch in allen Zellen des menschlichen Organismus vor.² Sie bestehen aus mehrfach verdrehten und zusammengelagerten, länglichen Monomeren. Es werden jeweils acht Tetramere zu einem Filament gewunden. Auch

wenn sie leichter zu verformen sind als Mikrotubuli, sind die Intermediärfilamente durch ihren Aufbau sehr reissfest und können starken Spannungen standhalten. Es existieren verschiedene Familien von Intermediärfilamenten, die jeweils für einen Zelltyp spezifisch sind, so zum Beispiel Keratin, welches ausschliesslich in Epithelzellen und Hautanhangsgebilden vorkommt.² Vimentin, auch ein Vertreter der Intermediärfilamente, wird insbesondere in mesenchymalen Zellen wie Granulozyten und Monozyten, exprimiert. In Zellen des Megakaryo- und Erythropoese-Systems lässt sich hingegen kein Vimentin nachweisen. Im Rahmen der myeloischen Zelldifferenzierung wird aufgrund der grösseren Spannung und Belastung, der Makrophagen ausgesetzt sind, vermehrt Vimentin produziert. Diese Eigenschaft macht das Intermediärfilament zu einem etablierten Differenzierungsmarker. Werden Monozyten mit Mitogenen wie PMA inkubiert und so zur Differenzierung zu Makrophagen stimuliert, kommt es, wie in Abbildung 3 dargestellt, zu einem Anstieg des Vimentinspiegels.⁸

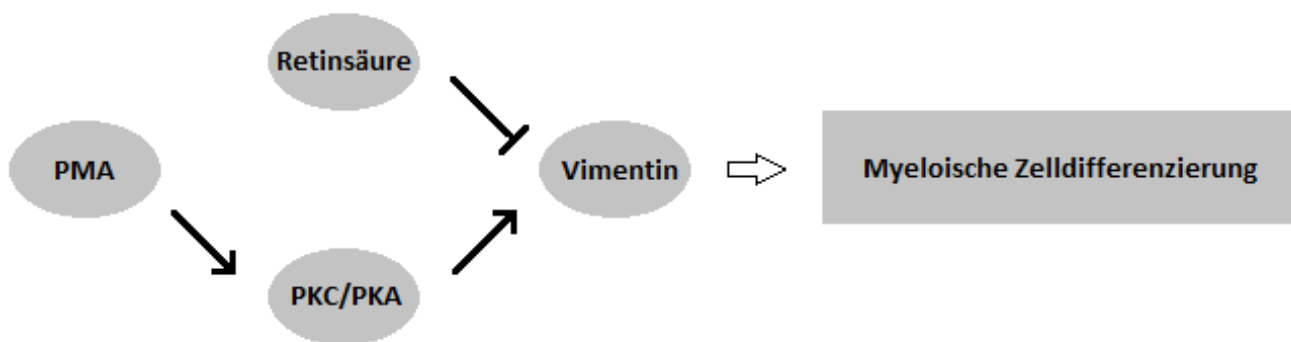


Abb. 3: Schematische Darstellung der Regulation von Vimentin. Die Vimentinexpression wird durch den PKC-Signalweg stimuliert und durch Retinsäure gehemmt. PMA, PKC (Protein Kinase C), PKA (Protein Kinase A).

2.2.2.3 c-Myc

c-Myc reguliert, wie in Abbildung 4 dargestellt, als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen der Zellproliferation und –Differenzierung. Es stimuliert durch die Heterodimerisierung mit Max (Myc-associated factor X) die Transkription von Genen, welche eine E-Box (Enhancer-Box, bestimmte, nicht kodierende DNS-Sequenz zur Erkennung von Genen) aufweisen. Dies resultiert in einer Proliferation der Zellen.⁹ Aufgrund des Ausmasses der durch c-Myc beeinflussten Gene wird von einem alternativen Regulationsmechanismus ausgegangen.^{9; 10} Denkbar sind c-Myc-induzierte, posttranslationelle Modifikationen von Histonen. Diese Modifikationen

umfassen Methylierung und Acetylierung und haben eine Transformationsänderung der Histone zur Folge.¹⁰ Als Protoonkogen spielt c-Myc eine entscheidende Rolle in der Genese verschiedener Neoplasien. Kommt es durch eine Mutation zu einer vermehrten Transkription des c-Myc-Gens, werden der natürliche Zellzyklus dereguliert und die maligne Entartung der betroffenen Zelle begünstigt. Ausserdem stimuliert c-Myc Zellen auch zur Apoptose, dem programmierten Zelltod. Einerseits kommt es durch eine Interaktion mit Bax zu einem vermehrten Ausstrom von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Die dadurch erhöhte Konzentration im Zytoplasma resultiert in der Aktivierung von Caspasen. Andererseits stimuliert c-Myc p19Arf, was wiederum die Aktivität von p53 erhöht. Sowohl aus der Aktivierung von Caspasen, als auch aus der von p53 folgt der programmierte Zelltod.¹¹ Während der Differenzierung von monozytären und granulozytären Zellen wird die c-Myc-Transkription inhibiert. Um eine Apoptose der Zellen während der Differenzierung zu verhindern, muss der c-Myc-Spiegel trotz massiver intrazellulärer Umstrukturierungen reduziert werden. Folglich kann eine tiefe c-Myc-Expression als inverser Marker für die myeloische Zelldifferenzierung genutzt werden.¹²

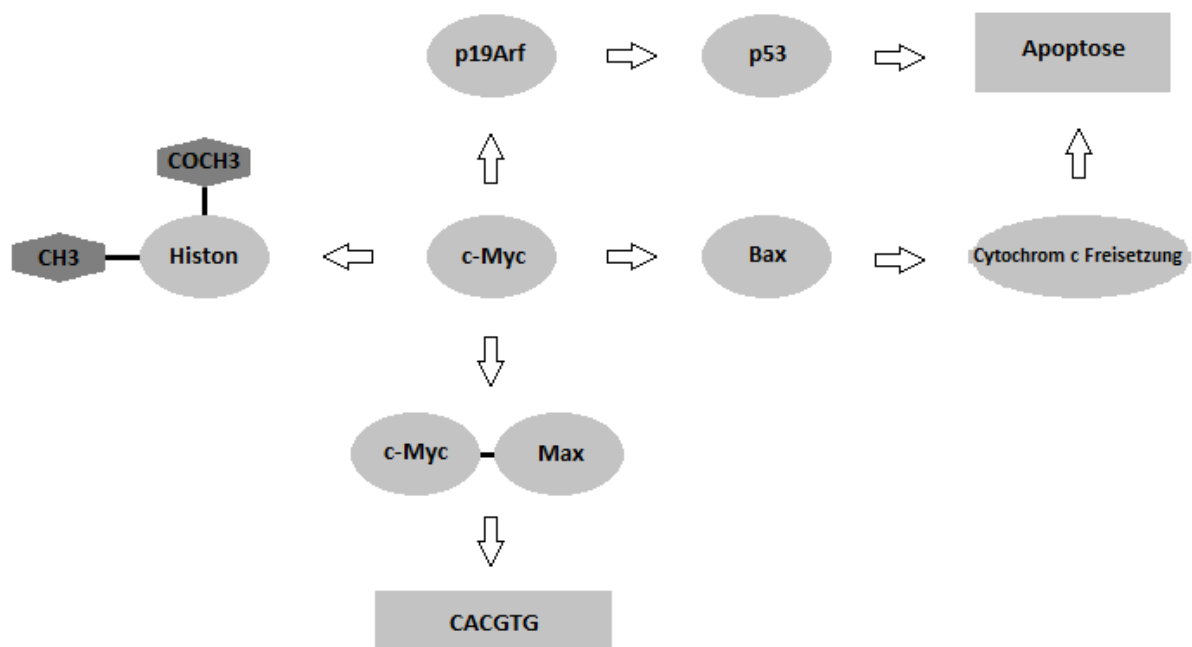


Abb. 4: Schematische Darstellung der intrazellulären Wirkung von c-Myc. Transkriptionsregulation einerseits über Heterodimerisierung mit Max und Bindung von E-Boxen (CACGTG-Sequenzen) und andererseits über Histonmodifikationen (Methylierung = CH₃ und Acetylierung = COCH₃). Apoptose-Induktion durch Bax und Cytochrom c-Freisetzung und über p19Arf- und somit p53-Stimulation.

2.3 Das Modellsystem

2.3.1 Die Zelllinie U937

Die humane Tumorzelllinie U937 ist ein weitverbreitetes *in vitro* Modell für monozytäre Zellen. Die Zelllinie wurde ursprünglich aus dem pleuralen Exsudat eines Patienten mit einem generalisierten histiozytären Lymphom gewonnen und weist diverse Eigenschaften von unreifen monozytären Zellen auf.^{4; 13} Die U937 Zellen können durch Inkubation mit verschiedenen Agenzien zur Differenzierung angeregt werden. Dazu zählen unter anderem Vitamin D₃-Derivate, Retinsäure und Thiophorbolester wie PMA.^{4; 13}

2.3.2 Myeloisches Differenzierungsmodell

PMA ist ein Phorbol, welches zweifach verestert ist, nämlich am zwölften Kohlenstoffatom mit Myrinsäure und am dreizehnten mit Essigsäure.¹⁴ Es wird unter anderem benutzt, um monozytäre Zellen *in vitro* zur Differenzierung zu stimulieren. Werden die suspensten und runden U937 Zellen mit PMA inkubiert, beginnen sie an Oberflächen zu adhären, Zell-Cluster zu formen und Pseudopodien auszubilden, ausserdem kommt es zu einem Proliferationsstopp.^{4; 13} Die Wirkung von PMA basiert, wie in Abbildung 5 dargestellt, auf der Aktivierung der PKC (Proteinkinase C), wobei das „C“ für ihre Kalzium-Abhängigkeit steht.² Die PKC-Familie umfasst 10 Isoenzyme, welche in drei Gruppen eingeteilt werden können. Die klassischen PKC-Isoformen benötigen zur Aktivierung Kalzium, DAG (Diacylglycerol) und Phosphatidylserin. Die neuen PKC-Isoformen benötigen kein Kalzium, aber DAG und Phosphatidylserin, und die atypischen PKC-Isoformen benötigen weder Kalzium noch DAG, sondern nur Phosphatidylserin.¹⁴ PMA hat eine ähnliche Struktur wie DAG und bindet wie dieses eine Cystein-reiche Sequenz der klassischen und neuen PKC-Isoformen. Durch diese Bindung entsteht eine hydrophobe Domäne, welche eine Bindung an die Zellmembran ermöglicht. So kann Phosphatidylserin besser binden. Durch die Bindung der aktivierenden Kofaktoren wird eine inhibitorische Pseudosubstrat-Domäne abgespalten und die PKC wird durch eine C-terminale Autophosphorylierung aktiviert und von der Zellmembran gelöst.¹⁴ Die aktivierte PKC führt ihrerseits durch Phosphorylierung zu einer Aktivierung verschiedener MAP-Kinasen wie ERK, JNK und p38/HOG1-Kinasen.^{14; 15}

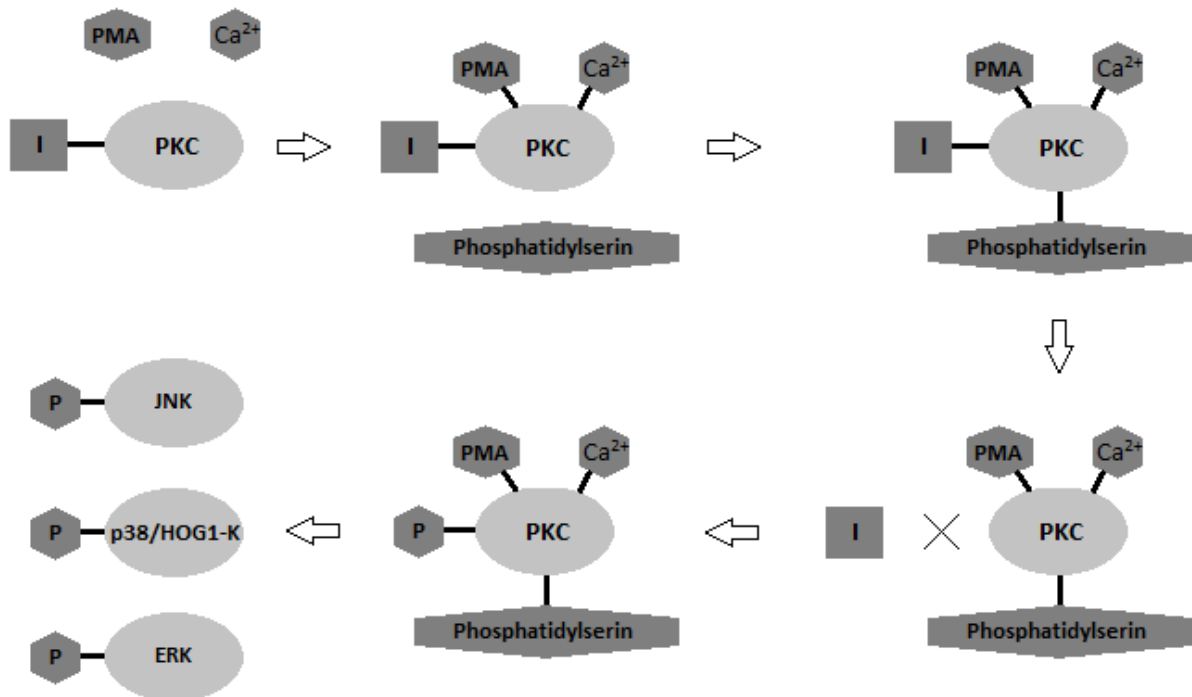


Abb. 5: Schematische Darstellung der PMA-induzierten, klassischen PKC-Aktivierung. Durch die PMA- und Ca^{2+} -Bindung (Kalzium) wird die Phosphatidylserin-Bindung erleichtert. Dadurch kommt es zu der Abspaltung der inhibitorischen Pseudosubstrat-Domäne (I) und zur Autophosphorylierung (P). Die dadurch aktivierte PKC phosphoryliert und aktiviert somit verschiedene MAP-Kinasen, wie JNK, p38/HOG1-K (high osmolality glycerol 1 Kinase) und ERK (Extrazelluläre signalregulierte Kinase).

2.4 Die Schwerkraft

Auf der Erde ist die Schwerkraft ein stetig vorhandener Einfluss und hat die Formen des Lebens auf dem Planeten geprägt.¹⁶ Erstmals formuliert wurde das Gravitationsgesetz durch Isaac Newton in den Jahren 1665/1666. Er beschrieb die Anziehungskraft F , welche eine Masse m_1 auf eine andere Masse m_2 in Abhängigkeit von der Distanz r zwischen den zwei Massen ausübt:

$$F = G \cdot (m_1 \cdot m_2 / r^2)$$

G , die Gravitationskonstante ist eine Naturkonstante und beträgt $6,673 \cdot 10^{-11} \text{ m}^3/\text{kg}/\text{s}^2$. Mit dieser Formel konnte Newton die Anziehungskraft der Erde auf den Mond beschreiben und auch erklären, weshalb er nicht wie der Apfel vom Baum auf die Erde fällt. Ausserdem liess sich die Berechnung der Erdbeschleunigung g ableiten. Indem er die Gravitationskraft F_g einer Masse m ihrer Gewichtskraft mg gleichsetzte erhielt er:

$$F_g = G \cdot (M_e \cdot m / r^2) = m \cdot g$$

Was sich umformulieren lässt zu:

$$g = G \cdot (M_e / r^2)$$

M_e entspricht der Masse der Erde, $5,98 \cdot 10^{24} \text{ kg}$, und wenn sich die Masse m in der Nähe der Erdoberfläche befindet, so entspricht r dem Erdradius R_e von $6,378 \cdot 10^6 \text{ m}$. Hiermit ergibt sich ein Wert von $9,810 \text{ m/s}^2$ für die Erdbeschleunigung g .¹⁷

Die Gravitationskraft der Erde wirkt auf alle Massen, abhängig von ihrer Distanz zum Erdmittelpunkt. Dass wir uns nicht auf diesen zubewegen, liegt an der Elastizität der Unterlage und der durch sie hervorgerufenen Gegenkraft. Im freien Fall bei minimalem Luftwiderstand befindet sich eine Masse also nicht im Zustand von Schwerelosigkeit, sondern von Gegenkraftslosigkeit. Tatsächliche Schwerelosigkeit kann nur entstehen in Abwesenheit jeglicher anderer Masse. Annähernde Schwerelosigkeit, auch Mikrogravitation genannt, herrscht allerdings im Weltall, wenn der Abstand zu den Gravitationsfeldern der Planeten gross genug ist.¹⁷

Die technologischen Fortschritte des letzten Jahrhunderts haben routinemässige, interplanetare Raumfahrt theoretisch möglich gemacht. Im Rahmen von bemannten Weltallmissionen konnten jedoch bei Astronauten diverse körperliche Veränderungen festgestellt werden, die sich nicht alleine durch die Immobilisation und die psychische Belastung erklären liessen. Mögliche Folgen von Schwerelosigkeit auf den menschlichen Körper zu kennen und ihnen gegebenenfalls entgegenzuwirken, ist für die Zukunft der Raumfahrt von grundlegender Bedeutung.¹⁶

2.5 Der Einfluss von Schwerelosigkeit auf den menschlichen Körper

2.5.1 Allgemeine Veränderungen

Längere Aufenthalte unter schwerelosen Bedingungen, wie dies bei Missionen auf der internationalen Raumstation der Fall ist, führen zu gravierenden Beeinträchtigungen verschiedenster menschlicher Funktionssysteme. Hierzu zählen unter anderem die Beeinflussung des Immunsystems, Knochendemineralisierung, Muskelatrophie, kardiovaskuläre Dekonditionierung und orthostatische Intoleranz. Durch die mehrfach beschriebene Immunschwäche wird das Auftreten von Infektionen sowie von Reaktivierungen latenter Infekte und grundsätzlich auch von Neoplasien begünstigt. Eine geschwächte Abwehr bedeutet nicht nur ein erhöhtes Infektionsrisiko, sondern auch schwerere Verläufe allfälliger Infektionskrankheiten, unter Umständen mit letalen Folgen.

Durch die Knochendemineralisierung werden die Knochen brüchiger und schon geringe Belastungen können zu Frakturen führen, ähnlich wie bei der bei postmenopausalen Frauen gut bekannten Osteoporose.

Durch Muskelschwäche, Dekonditionierung und orthostatische Reaktionen werden Stürze begünstigt, was zusammen mit der beschriebenen Verminderung der Knochendichte das Risiko für Knochenbrüche weiter erhöht.¹⁸ Um die Gesundheit und das Überleben der Astronauten auf längeren Raumfahrtmissionen zu sichern, ist es von grundlegender Bedeutung, die diversen Effekte zu kennen, welche die Schwerelosigkeit auf den menschlichen Körper hat.

2.5.2 Veränderungen des Immunsystems

Durch Vergleiche von Blutproben von Astronauten vor und nach Raumflügen konnten bereits diverse Veränderungen der Zahl und Funktion verschiedener Zellen des Immunsystems beschrieben werden.

Die neutrophilen Granulozyten wiesen verglichen mit den 10 Tagen vor Start gewonnenen Blutproben sowohl nach 5-tägigen, wie auch nach 9 – 11-tägigen Raumfahrtmissionen eine Erhöhung ihrer Zahl auf. Zumindest partiell kann dieser Anstieg der Demargination zugeschrieben werden. Hierbei werden bei akutem Bedarf Kapillarendothel-gebundene Zellen in den zirkulierenden Zellpool mobilisiert, was deutlich schneller realisierbar ist als die Neusynthese von neutrophilen Granulozyten. Eine verminderte Funktion dieser Zellen des innate Immunsystems bezüglich der Phagozytose von *Escherichia coli* sowie bezüglich der Oxidative Burst-Kapazität zeigte sich nach 9 – 11 Tagen, nicht jedoch nach 5 Tagen bei verminderter Schwerkraft.¹⁹

Meehan et al. zeigten 1992 eine Reduktion sowohl der CD4+, wie auch der CD8+ T-Lymphozyten nach 4 – 5 Tagen unter Bedingungen verminderter Schwerkraft. Nach 6 – 8 täglichen Raumfahrtmissionen blieb die Zahl der T-Lymphozyten, wichtigen Zellen des adaptiven Immunsystems, stabil. Es fielen allerdings eine verminderte Reaktivität auf die Stimulation mit Phytohämagglutinin, sowie eine gehemmte Proliferationsaktivierung durch CD4+ T-Helferzellen auf.²⁰

Eine Verminderung des prozentualen Anteils an natürlichen Killerzellen trat nach 4 – 5-tägigen Raumflügen auf und persistierte drei Tage nach Landung.²¹

Die durch den Raumflug induzierten Veränderungen des humanen Immunsystems resultieren in einem schlechteren Schutz des Organismus vor Infektionen – einem erworbenen Immundefizit.²⁰ Durch diese Abwehrschwäche kann es zu opportunistischen Infektionen kommen. Hierunter versteht man Infektionen mit Keimen, die bei normaler Abwehrlage nicht humanpathogen sind. Ebenso können Reinfektionen mit Keimen auftreten, welche das Immunsystem in der Vergangenheit bereits erfolgreich bekämpft hat.

In der grundsätzlich sterilen Umgebung der Raumschiffe sind besonders Infektionen mit Keimen der endogenen, mikrobiellen Flora der Astronauten zu erwarten. Hierbei spielen Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und β -hämolisierende Streptokokken eine Rolle, genau wie die Viren Influenzavirus,

Herpes simplex Virus 1 und 2 und Epstein Barr Virus. Zu befürchten sind Infektionen des Respirationstraktes, der Zähne, sowie allfälliger Wunden.^{22; 23}

2.5.3 Veränderungen des Monozyten-Makrophagen-Systems

Die Reaktion der Monozytenzahl auf Mikrogravitation war Gegenstand verschiedener Studien. 1992 konnten Meehan et al. einen Anstieg der Monozytenzahl nach vier- bis fünftägigen sowie einen Abfall derselben nach sechs- bis achttägigen Raumfahrtmissionen feststellen.²⁴ 2005 präzisierten Kaur et al. diesen Anstieg der Monozytenzahl auf Bedingungen verminderter Schwerkraft als transienten Effekt, welchen sie nach fünftägigen Missionen noch nachweisen konnten, nicht jedoch nach neun- bis elftägigen Aufenthalten in schwerelosiger Umgebung.²¹

Neben der absoluten Monozytenzahl konnten auch Veränderungen ihrer Aktivität und Funktion detektiert werden. Kaur et al. beschrieben bei fünf- bis elftägigen Raumfahrtmissionen eine reduzierte Phagozytose-Kapazität pro Monozyt. Der verminderte Phagozytose-Index trat schon zehn Tage vor Start auf und persistierte sowohl in den Proben, welche direkt wie auch drei Tage nach der Landung gewonnen wurden.²¹ In der gleichen Studie zeigte sich eine verminderte Oxidative Burst-Kapazität der Monozyten 10 Tage vor und 3 Tage nach Raumfahrtmission.²¹ Auch die durch Fc-Rezeptor-Bindung induzierte Degranulation, gemessen an der Elastase-Freisetzung aus den Granula in die Phagozytose-Vakuolen, war bereits zehn Tage vor, aber auch direkt und drei Tage nach Landung in den Monozyten der Astronauten tiefer als in jenen der Kontrollgruppe.²¹ Auf molekularer Ebene wiesen Kaur et al. zu allen Messzeiten eine verminderte Expression von Fc γ RI (CD64, Cluster of Differentiation) und Fc γ RII (CD 32) nach. Als Bestandteile des Fc γ -Rezeptors spielen diese Oberflächenmoleküle eine wichtige Rolle in der Internalisation von mit Immunglobulinen opsonierten Bakterien. Drei Jahre später beschrieb die gleiche Forschungsgruppe eine gesteigerte Expression von TLR4 (Toll-like Receptor 4) nach zehn- bis dreizehntägigen Raumfahrtmissionen. Diese Veränderung trat bereits zehn Tage vor Abflug auf und konnte auch direkt nach der Landung sowie fünfzehn Tage später nachgewiesen werden. Verglichen mit der Expression vor und fünfzehn Tage nach dem Raumflug, wurde der TLR4 direkt nach der Raumfahrtmission signifikant weniger exprimiert. Der TLR4 spielt eine wichtige Rolle in der Bindung des bakteriellen Oberflächenmoleküls LPS (Lipopolysaccharid).²⁵

Ebenfalls bei zehn- bis dreizehntägigen Raumflügen wurde die Zytokinproduktion der Monozyten nach Exposition gegenüber bakterieller Toxine gemessen, zehn Tage vor Abflug, direkt nach der Landung und fünfzehn Tage später. Zu allen Messzeiten fielen eine gesteigerte Sekretion von IL-1ra (Interleukin 1 Rezeptor-Antagonist) sowie eine verminderte von IL-1 β (Interleukin 1 β) auf. IL-1ra und IL-1 stehen in einem Gleichgewicht, wobei IL-1 zu einer Entzündungsreaktion führt. Es stimuliert Zellen des innate Immunsystems und induziert die Transkription der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8. Die Raumflug-induzierten Veränderungen führen zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zu Gunsten des inhibierenden IL-1ra und somit zu einer Unterdrückung von Entzündungsreaktionen.²⁵

Zusammengefasst führen die beschriebenen, mikrogravitationsinduzierten Veränderungen zu einer Hemmung der Monozyten und der von ihnen abstammenden Makrophagen mit einer eingeschränkten Abwehr gegenüber Bakterien und Pilzen. Im Gegensatz zu den beobachteten Veränderungen bei neutrophilen Granulozyten führt die dezimierte Funktion der Monozyten nicht zu einem anhaltenden Anstieg ihrer Zahl und es resultiert ein verminderter Schutz des Organismus durch das Monozyten-Makrophagen-System.^{24; 25}

2.6 Modellsysteme für die Erzeugung von Schwerelosigkeit

Um den Zustand von Schwerelosigkeit auf der Erde, wo die Schwerkraft einen dauerhaften Zustand darstellt, zu untersuchen, muss die Mikrogravitation mittels Modellsysteme simuliert werden. Die verschiedenen Modelle wurden in Abbildung 6 zusammengefasst. Hierbei muss zwischen realer Mikrogravitation bei aufgehobener Erdanziehungskraft und Simulation durch Aufhebung des Gravitationsvektors unterschieden werden.¹¹

Simulierte Schwerkraft kann mithilfe von Klinostaten untersucht werden. Diese rotieren suspende Zellen mit einer konstanten Drehzahl, so dass der Gravitationsvektor gleichmässig von allen Seiten auf die Zellen einwirkt. Ein Klinostat ist leicht verfügbar, erlaubt allerdings nur die Untersuchung einzelner Zellen oder kleiner Organismen.²⁶

Ähnliche Veränderungen wie nach Weltallmissionen traten bei „Bedrest“-Studien auf. Durch längeres Ausharren in einer Position mit tiefgelagertem Kopf konnten Mikrogravitationsinduzierte Effekte reproduziert werden. Auch „Bedrest“-Studien

bedeuten wenig Aufwand und Material, sie können jederzeit durchgeführt werden und erlauben die Untersuchung des menschlichen Körpers als Ganzes, die Übertragbarkeit der Resultate ist allerdings eingeschränkt.²⁷

Die Analogie von Gegenkraftslosigkeit im freien Fall und Schwerelosigkeit nutzten Forscher unter anderem mit dem Fallturm. Mit einer Höhe von 120 Metern erreicht man 4,74 Sekunden freien Fall. Dieses Modell eignet sich somit besonders für die Untersuchung von schnell ablaufenden Prozessen.²⁶

Das gleiche Prinzip wird bei Parabelflügen genutzt. Durch steiles Ansteigen des Flugzeugs nach oben und anschliessendes Drosseln der Schubkraft fliegt das Flugzeug eine Parabel, wobei für 22 Sekunden Mikrogravitationsbedingungen herrschen im Wechsel mit fast doppelter Erdbeschleunigung. An einem Flugtag können 31 Parabeln geflogen werden, was eine kumulierte Schwerelosigkeit von 11.3 Minuten ergibt. Auch für die Untersuchung mit Parabelflügen eignen sich besonders schnelle Veränderungen.²⁶

Die Forschungsraketen TEXUS (Technologische Experimente unter Schwerelosigkeit) und MAXUS ermöglichen die Nutzung von Mikrogravitation für mehrere Minuten ohne Unterbrechung und spielen besonders in der Vorbereitung von Experimenten für die Internationale Raumstation ISS eine wichtige Rolle. Die Raketen fliegen 250 respektive 750 Kilometer hoch, somit werden für 6 respektive 13 Minuten annähernde Schwerelosigkeit generiert. Allerdings sind keine bemannten Flüge möglich und die Verfügbarkeit ist bei durchschnittlich einer Kampagne pro Jahr deutlich eingeschränkter als bei Simulationsmodellen.²⁶

Reale Mikrogravitation herrscht nur im Weltall ausserhalb der planetaren Gravitationsfelder. Ihrer Erforschung stehen unter anderem die internationale Raumstation ISS, Satelliten und das chinesische Raumschiff Shenzhou zur Verfügung. Hier sind auch längerfristige Analysen möglich, die Forschungsplätze sind allerdings nur sehr begrenzt vorhanden.

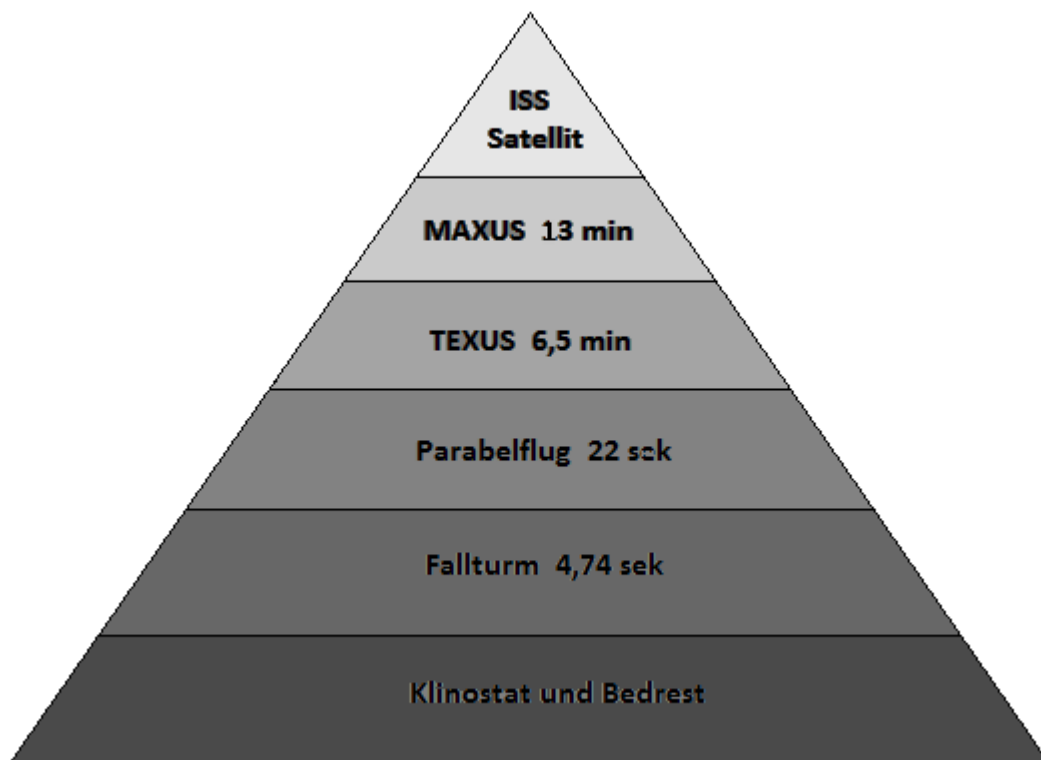


Abb. 6: Darstellung der verschiedenen Möglichkeiten zur Erforschung der Schwerelosigkeit. Mit steigender Mikrogravitationsdauer nimmt die Verfügbarkeit ab.

Körperliche Veränderungen bei Astronauten sind multifaktoriell bedingt, da während eines Raumfluges nicht nur die verminderte Schwerkraft auf sie Einfluss nimmt. Es kommen weitere physikalische Einflüsse wie zum Beispiel Strahlung hinzu, aber auch physische und psychische wie Isolation und Erschöpfung.²¹

Da sie alle nur einen Teil der Raumfahrt-Effekte simulieren können, sind die für Forschungszwecke erschaffenen Modelle nur Annäherungen an die tatsächlichen Bedingungen während eines Raumfluges. Mithilfe dieser Modelle, wie zum Beispiel dem Parabelflug oder „Bedrest“-Studien, ist es jedoch möglich, die diversen Systeme des menschlichen Körpers hinsichtlich dieser verschiedenen Faktoren zu untersuchen. Mittels simulierter Schwerelosigkeit, wie beispielsweise durch Klinorotation, können das Immunsystem isoliert und insbesondere das Monozyten-Makrophagen-System bezüglich seiner Reaktion auf Mikrogravitation untersucht werden.

2.7 Der 2D-Klinostat

Die Klinorotation ist eine etablierte Methode, um bei vorhandener Schwerkraft Schwerelosigkeit zu simulieren. Das erste Mal wurde er vor über 100 Jahren von dem Pflanzenbiologen Julius Sachs zur Studie des Gravitropismus benutzt.²⁰

Der Klinostat ersetzt, wie in Abbildung 7 dargestellt, den zum Erdmittelpunkt gerichteten Gravitationsvektor der Zellen durch einen omnilateralen Vektor.

Der zweidimensionale Klinostat, was konstante Neigung bedeutet, ermöglicht die Rotation eines Objekts um seine Achse waagrecht zum Schwerkraftvektor. Der ursprüngliche Klinostat von Julius Sachs drehte mit einer Umdrehung pro Minute. Um die Wahrnehmung der Rotationsbewegung zu verhindern, drehen heutige Klinostaten schneller mit 60 – 120 Umdrehungen pro Minute. Die Rotation verhindert die intrazelluläre Sedimentation von Partikeln entlang ihres Schwerkraftvektors und führt zu einer homogenen Verteilung derselben in der Zelle. Ebendies tritt auch im Weltall bei realer Mikrogravitation auf.²⁶

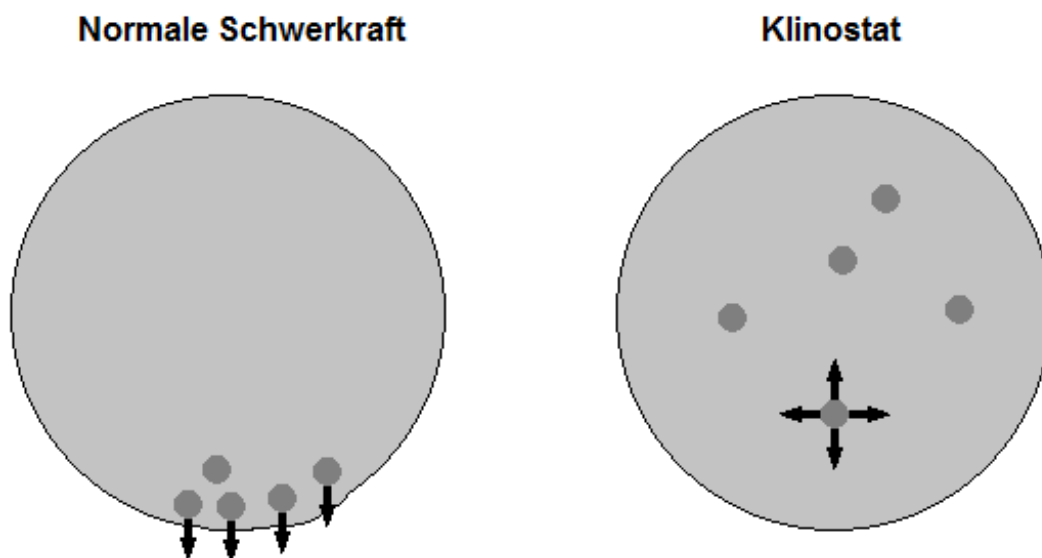


Abb. 7: Funktionsprinzip der Klinorotation. Durch die kontinuierliche Rotation der suspenten Zellen hebt sich der Gravitationsvektor auf, und sowohl die intrazellulären Partikel als auch die Zellen werden an der Sedimentation gehindert.

3. Fragestellung

Es ist von grundlegender Bedeutung für die Zukunft der Raumfahrt, die durch die Schwerelosigkeit hervorgerufenen Veränderungen bezüglich des menschlichen Immunsystems zu kennen. Nur so sind eine angemessene Prävention und Reaktion auf Infektionen und Reaktivierungen von latenten Infektionen möglich. Insbesondere für die Planung und Durchführung längerer Missionen, wie beispielsweise zum Mars, ist es wichtig, auf eine allfällige Immunschwäche der Astronauten entsprechend vorbereitet zu sein.

Diese Arbeit befasst sich mit der Frage, wie sich Schwerelosigkeit auf die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen auswirkt. Dazu wurden folgende Detailfragen bearbeitet:

1. Welches ist die optimale Zellkonzentration, um eine gute Zellvitalität während der Klinorotation zu gewährleisten?
2. Wie lange überleben monozytäre Zellen bei Klinorotation ohne Zugabe neuer Nährstoffe?
3. Hat simulierte Mikrogravitation einen Einfluss auf die Zellvitalität?
4. Hat simulierte Mikrogravitation einen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten von monozytären Zellen?
 - a) Verändert sich die monozytäre Expression von c-Jun durch die Klinorotation?
 - b) Verändert sich die monozytäre Expression von Vimentin durch die Klinorotation?
 - c) Verändert sich die monozytäre Expression von c-Myc durch die Klinorotation?

Um die erwähnten Fragen zu beantworten, wurden monozytäre Zellen der Zelllinie U937 in verschiedenen Konzentrationen für 24, 48 und 72 Stunden klinorotiert. Die Zellzahl und –Vitalität wurde mittels Trypanblau-Färbung ermittelt. Die Zellen aus den Klinostatenversuchen wurden gepoolt und ihre Proteinexpression mittels Western Blot und anschliessender Antikörperfärbung analysiert.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Zellen

| Bezeichnung | Konzentration | Firma |
|--------------------|--------------------------|-------|
| Humane U937 Zellen | 0,1 - $5 \cdot 10^6$ /ml | ATCC |

4.1.2 Chemikalien

4.1.2.1 Lösungen

| Bezeichnung | Substanz | Konzentration/An teil | Firma |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------|
| Medium | RPMI (Roswell Park Memorial Institute)- Medium 1640 | 90% | Biochrom |
| | FCS (Fetales Kälberserum) | 9% | Biochrom |
| | Glutamin | 0,9% | Sigma- Aldrich |
| | HEPES (2-(4-(2- Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)- Ethansulfonsäure) | 0,9% | Sigma- Aldrich |
| Trypanblau | Trypanblau | 50% | Sigma- Aldrich |
| Einfriermedium | RPMI-Medium 1640 | 80% | Biochrom |
| | DMSO (Dimethylsulfoxid) | 20% | Sigma- Aldrich |

| | | | |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------|---------------|
| PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) | NaCl (Natriumchlorid) | 7,26% | Merck |
| | KCl (Kaliumchlorid) | 0,18% | Merck |
| | Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O (Dinatriumhydrogenphosphat) | 1,64% | Merck |
| | KH ₂ PO ₄ (Kaliumhydrogenphosphat) | 0,22% | Merck |
| PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat | PMA in DMSO | 25 nM | Sigma-Aldrich |
| EDTA (Ethylendiamintetraacetat) | EDTA in PBS | 16,67% | Roth |
| Triton X-100 Lysepuffer | Na ₃ VO ₄ (Natriumorthovanadat) | 100 mM | Sigma-Aldrich |
| | NaF (Natriumfluorid) | 500 mM | Merck |
| | EDTA | 500 mM | Roth |
| | Tris (Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan) | 1 M | Merck |
| | NaCl | 5 M | Merck |
| | Triton X-100 | 1,15% | Fluka |
| Lysepuffer | Triton X-100 | 98,1% | |
| | Proteaseinhibitorcocktail | 1,3% | Sigma-Aldrich |
| | PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) | 0,6% | Roth |

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------|---------------|
| | d) | | |
| BSA | Bovines Serum Albumin | | Biochrom |
| BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay Reagent | Reagenz A | 98% | Pierce |
| | Reagenz B | 2% | Pierce |
| Trenngelpuffer (4x) | Tris | 0,5 M | Merck |
| | SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat) | 0,4% | Sigma-Aldrich |
| | HCl (konzentrierte Salzsäure) zum Einstellen auf pH 8,8 | | Merck |
| Sammelgelpuffer (4x) | Tris | 0,5 M | Merck |
| | SDS | 0,8% | Sigma-Aldrich |
| | HCl zum Einstellen auf pH 6,8 | | Merck |
| Laufpuffer (10x) | Tris | 250 mM | Merck |
| | Glycin | 1,92 M | Sigma-Aldrich |
| | SDS | 34,7 mM | Sigma-Aldrich |
| | HCl zum Einstellen auf pH 8,4 | | Merck |
| Trenngel (2 Gele, pH | H ₂ O | 40,4% | |

| | | | |
|-----------------------------------|-------------------------------|--------|---------------|
| 8,8) | | | |
| | PAA (Polyacrylamid) 40% | 30% | Merck |
| | Trenngelpuffer (4x) | 25% | |
| | Glycin 50% | 4% | Merck |
| | APS (Ammonium-Persulfat) | 0,5% | Sigma-Aldrich |
| | TEMED (Tetra-Methylen-Diamin) | 0,1% | Sigma-Aldrich |
| Sammelgel (2 Gele, pH 6,8) | H ₂ O | 61,23% | |
| | PAA | 12,5% | Merck |
| | Sammelgelpuffer (4x) | 25% | |
| | Glycin 50% | 0,5% | Merck |
| | APS | 0,66% | Sigma-Aldrich |
| | TEMED | 0,1% | Sigma-Aldrich |
| Probenpuffer (4x) | Tris | 10% | Merck |
| | SDS | 20% | Sigma-Aldrich |
| | Na-EDTA (50 nM) | 0,68% | Roth |
| | Bromphenolblau | 2% | Sigma-Aldrich |
| | Glycerin | 40% | Merck |
| | β-ME (Beta-Mercapto- | 20% | Fluka |

| | | | |
|-----------------------------------------|----------------------|--------------|---------------|
| | Ethanol) | | |
| Page ruler, prestained protein marker | | | Fermentas |
| Isopropanol | | | Maduzi |
| Transferpuffer | Tris | 25 mM | Merck |
| | Glycin | 192 mM | Merck |
| | Methanol | 20% | Merck |
| Coomassie-Färbelösung | Methanol | 40% | Merck |
| | HCl | 10% | Merck |
| | Coomassie blue R 250 | 1,21 mM | Serva |
| Gel-Entfärbelösung | Methanol | 30% | Merck |
| | HCl | 10% | Merck |
| Blocking-Puffer | | 50% in PBS | Li-COR |
| TBS (Tris-gepufferte Salzlösung) | Tris | 0,2 M | Merck |
| | NaCl | 1,37 M | Merck |
| TBS-Tween 20 | Tween 20 | 0.05% in TBS | Sigma-Aldrich |

4.1.2.2 Antikörper

4.1.2.2.1 Primärantikörper

Die monoklonalen Primärantikörper wurden mit 5% BSA in TBS-Tween 20 in den nachfolgend aufgeführten Verdünnungen angesetzt.

| Zielprotein | Spenderspezies | Bestellnummer | Verdünnung | Firma |
|--------------------|-----------------------|----------------------|-------------------|----------------|
| c-Jun | Rabbit | #9165 | 1:250 | Cellsignalling |
| Vimentin | Mouse | V6630 | 1:400 | Sigma-Aldrich |
| c-Myc | Rabbit | #5605S | 1:500 | Cellsignalling |
| Actin | Mouse | A5316 | 1:3000 | Sigma-Aldrich |
| GAPDH | Rabbit | #2118 | 1:1000 | Cellsignalling |

4.1.2.2.2 Sekundärantikörper

Die Sekundärantikörper wurden 1:10'000 verdünnt in einer 1:2 Verdünnung von LI-COR Blocking-Puffer mit PBS.

| Zielprotein | Spenderspezies | Bestellnummer | Emissions-Wellenlänge | Firma |
|--------------------|-----------------------|----------------------|------------------------------|--------------|
| Rabbit-IgG | Donkey | 926-32223 | 680 nm (rot) | LI-COR |
| Rabbit-IgG | Donkey | 926-32213 | 800 nm (grün) | LI-COR |
| Mouse-IgG | Donkey | 926-32222 | 680 nm (rot) | LI-COR |
| Mouse-IgG | Donkey | 926-3221 | 800 nm (grün) | LI-COR |

4.1.3 Geräte

| Gerät | Firma |
|----------------------------------|--------------------------|
| Laminar Flow Sicherheitswerkbank | Esco |
| Wasserbad | GFL |
| Bunsen Brenner | Integra |
| Akku-Pipettierhilfe | Integra |
| Vakuumpumpe | Integra |
| Lichtmikroskop | Leica |
| Zentrifuge | Thermo Fischer |
| Inkubator | Labtec Services AG |
| Nalgene Freezing Container | Sigma-Aldrich |
| Kühlschrank 4°C | Sibir |
| Kühlschrank -20°C | Sibir |
| Kühlschrank -80°C | Thermo Scientific |
| Kühlschrank -150°C | Sanyo |
| Klinostat | DLR |
| Inkubator für Klinostat | Heraeus |
| Vortex | Bender und Hobein AG, CH |
| Zell-Ultraschall-Sonifizierer | Ultrasonics Heat systems |
| Mikropipette, 1-10 µl | Gilson, CH |
| Mikropipette, 2-20 µl | Gilson, CH |
| Mikropipette, 50-200 µl | Gilson, CH |

| | |
|---------------------------|-----------------------|
| Mikropipette, 200-1000 µl | Gilson, CH |
| Mikropipette, 500-5000 µl | Vaudaux-Eppendorf, CH |
| Mehrkanalpipette | Eppendorf |
| Plattenleser | BioTek |
| Eppendorf-Thermomixer | Eppendorf |
| Eppendorf-Zentrifuge | Gilson, Schweiz |
| Elektrophorese-Kammer | Bio Rad |
| Stromversorgungseinheit | Bio Rad |
| Nitrozellulosemembran | Pierce |
| Western Blot-Kammer | Bio Rad |
| Schüttler | Biosan |
| Tube Roller | Stuart |
| Scanner Odyssey | LI-COR |

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

Die U937 Zelllinie ist ein *in vitro* Modell für humane Monozyten. Sie entstammen dem Aspirat eines Pleuraergusses eines Patienten mit einem generalisierten histiozytären Lymphom. Die Zellen weisen diverse Eigenschaften von humanen Monozyten auf. Sie wachsen in Suspension und ihre Oberfläche ist glatt und rund. Werden sie mit Differenzierungsinduktoren wie PMA inkubiert, reifen sie zu postmitotischen Zellen mit Pseudopodien und Phagozytose-Aktivität.^{4; 13}

Die Zellen wurden mit RPMI-Nährmedium (1% HEPES, 1% Glutamin, 10% FCS) bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte bei Erreichen von 1 x 10⁶ Zellen/ml auf eine Konzentration von 1 – 2 x 10⁵ Zellen/ml.

Zentrifugiert wurde für 8 Minuten bei 330g.

Die Zellkonzentration und –Vitalität wurden mittels Trypanblau-Färbung ermittelt.¹³ Trypanblau diffundiert passiv in die Zellen hinein, wohingegen der Auswärtstransport aktiv, unter ATP-Verbrauch erfolgt. Nicht vitale Zellen sind nicht mehr in der Lage, das Trypanblau hinaus zu transportieren. Daher wurden blaue Zellen als nicht vital definiert. Gezählt wurde mittels Neubauer Zählkammer. Zellen für spätere Versuchsfolgen wurden bei -150°C in Einfriermedium (80% RPMI-Medium 1640, 20% DMSO) mit einer Konzentration von 10⁶ Zellen/ml aufbewahrt. Hierfür wurden die Zellen nach mindestens 14 Tagen Kultur nach der Zentrifugation rasch in knapp aufgetautem Einfriermedium resuspendiert und nach 24 Stunden bei -80°C in einer Gefrierbox nach -150°C transferiert.

4.2.2 Klinorotation

Alle Klinostatenversuche wurden an drei unabhängigen Tagen nacheinander durchgeführt. Der Klinostat befindet sich in einem Inkubator bei 37°C. Er bietet Platz für zehn 1 ml-Pipetten, welche um ihre horizontale Achse mit einer Geschwindigkeit von 60 Umdrehungen pro Minute rotiert werden.

Für die Vitalitätsbestimmung wurde 24 h, 48 h und 72 h rotiert. Es wurden zehn Konzentrationen zwischen 0,5 – 5 x 10⁶ Zellen/ml eingesetzt. Bestimmt wurden Zellzahl und Vitalität mittels Trypanblau-Färbung. Gezählt wurde mittels Neubauer-Zählkammer.

Für die Immunoblot-Experimente mit unstimulierten Zellen wurden 2 x 10⁶ Zellen/ml für 24 h und 1 x 10⁶ Zellen/ml für 48 h und 72 h in die Klinorotation eingesetzt. Es

wurden je sechs Pipetten für die 1g-Kontrollen und μg -Proben mit 1 ml Zellsuspension befüllt. Das Befüllen und Beladen des Klinostaten dauerte ca. 15 min. Nach der Klinorotation wurde der Zellstoffwechsel mittels Einsatz von 4° C kaltem PBS verlangsamt. Zwischen Beenden der Klinorotation bis zum Aufnehmen aller Proben in 4°C PBS vergingen 10 – 60 Sekunden. Es wurden jeweils die sechs zusammengehörigen 1g-Kontrollen oder μg -Proben gepoolt, so dass ein Zellpellet von 6×10^6 – 12×10^6 Zellen/ml pro Gruppe entstand. Die Zahl und Vitalität der Zellen wurden durch Färbung mit Trypanblau und Auszählung in einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 330g zentrifugiert und mit kaltem PBS dreimal gewaschen. Die Lagerung erfolgte als Trockenpellet bei -20°C. Die Klinostatenversuche mit stimulierten Zellen wurden mit einer Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml und einer PMA-Konzentration von 25 nM für 72 h durchgeführt. Die Pipetten und der Klinostat wurden analog zu dem Vorgehen bei unstimulierten Zellen befüllt. Nach der Klinorotation wurde zunächst wie bei den unstimulierten Zellen vorgegangen. Die Proben wurden zu gekühltem PBS gegeben und die Pipetten mit diesem gespült. Danach wurden die Pipetten mit 0,02% EDTA befüllt, für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nachher zu gekühltem PBS pipettiert. Die Zellzahl und Vitalität suspenter und adhärenter Zellen wurden separat bestimmt.

4.2.3 Western Blot

Aus den Klinostatenversuchen resultierten 24 Zellpellets, deren Proteine mittels Western Blot analysiert wurden.

| Inkubationszeit in Klinostat | PMA | Zellen pro Pellet | Gravitation | Anzahl Proben (n) |
|------------------------------|-----|------------------------|---------------|-------------------|
| 24 Stunden | - | $12 \cdot 10^6$ Zellen | 1g | 3 |
| 24 Stunden | - | $12 \cdot 10^6$ Zellen | μg | 3 |
| 48 Stunden | - | $6 \cdot 10^6$ Zellen | 1g | 3 |
| 48 Stunden | - | $6 \cdot 10^6$ Zellen | μg | 3 |
| 72 Stunden | - | $6 \cdot 10^6$ Zellen | 1g | 3 |
| 72 Stunden | - | $6 \cdot 10^6$ Zellen | μg | 3 |

| | | | | |
|------------|-------|-----------------------|---------------|---|
| 72 Stunden | 25 nM | $6 \cdot 10^6$ Zellen | 1g | 3 |
| 72 Stunden | 25 nM | $6 \cdot 10^6$ Zellen | μg | 3 |

4.2.3.1 Zelllyse

Die Zellen wurden mittels Ultraschall und hypoosmolarem Lysepuffer lysiert. Die Hypoosmolarität und die Zugabe eines Detergens (Triton X-100) zu dem Puffer führen zu einer Zellschwellung und Auflösung der Membranstruktur mit anschliessender Ruptur der Zellmembran. Die Zellpellets wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Sonifizierung wurde mit 10 Ultraschallstössen pro Pellet mit einer power control von 5.5 W/cm^2 und einer duty control von 60% durchgeführt. Anschliessend wurden die Lysate bei 450g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand, welcher den lysierten Zellinhalt enthielt, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

4.2.3.2 Proteinbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde im Überstand des Lysats durchgeführt. Die Färbung der Proteine erfolgte mittels BCA Protein Assay Kit. Als erstes wurde ein Leerwert aus Lysepuffer auf die 96 Well-Platte aufgetragen, darunter die Standardreihe aus BSA und Aqua bidest. Danach folgten die Proben, welche zuvor mit Lysepuffer 1:10, 1:20 und 1:50 verdünnt worden waren, jede Verdünnung wurde dreifach aufgetragen. In jedes Well wurden 20 μL der Probe und 200 μL des BCA-Färbereagens pipettiert, die Platten wurden für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschliessend im Plattenleser bei 550 nm ohne Referenzfilter analysiert.

Das Färbereagenz färbt Proteine an, so dass die Proben in Abhängigkeit des Proteingehaltes unterschiedlich stark anfärben. Gemessen wird im Plattenleser die Konzentrationsabhängige Lichtabsorption. Durch Verrechnung dieser Extinktionswerte mit jenen der Standardreihe mit bekannter Proteinkonzentration kann die effektive Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden.

4.2.3.3 Gelelektrophorese

Die Tertiärstruktur der Proteine wurde sowohl chemisch, wie auch thermisch zerstört. Hierfür wurden jeweils 40 µg Protein mit 5 µL SDS und β-Mercaptoethanol enthaltendem Probenpuffer gemischt und mit Aqua bidest auf 20 µL aufgefüllt. Hierbei dient β-Mercaptoethanol der Trennung von Wasserstoffbrücken und SDS der gleichmässigen negativen Ladung der entfalteten Proteine, ihrer Grösse entsprechend und unabhängig von der jeweiligen Aminosäuresequenz. Nach der Erhitzung auf 95°C für fünf Minuten wurden sie gekühlt.

Durch die gleichmässige negative Ladung wandern die Proteine während der Elektrophorese durch das Netz des Polyacrylamids Richtung Anode und werden so nur nach ihrer Grösse, nicht nach ihrer Sequenz oder ursprünglichen Ladung aufgetrennt. Hierfür wurde ein Polyacrylamid-Gel, eingebaut in einer mit SDS-haltigem Laufpuffer gefüllten Apparatur, verwendet. Die Proben wurden zuerst in einem 5%-Sammelgel auf eine einheitliche Laufhöhe gebracht, um dann im 12%-Trenngel aufgetrennt zu werden. Je höher die Konzentration des Gels, desto engmaschiger die Struktur. Von jeder Probe wurden 40 µg Protein aufgetragen. Das Ladevolumen war in allen Geltaschen gleich. Als Grössenmarker für die Proteine wurde in die erste Geltasche 1 µl eines Page-Rulers pipettiert. Die Elektrophorese wurde, um eine Überhitzung zu verhindern, auf Eis durchgeführt; die ersten 15 Minuten während der Passage des Sammelgels bei 100 Volt und dann für 60 Minuten bei 200 Volt.

4.2.3.4 Western Blot

Für eine optimale Bindung der Proteine an die Nitrozellulosemembran wurden die Gele nach der Elektrophorese in Methanol-haltigem Transferpuffer gewaschen. Um die Proteine von dem Gel auf die Nitrozellulosemembran zu übertragen, wurde auf eine Schaumstoffmatte ein Filterpapier gelegt, darauf die Membran, dann das Gel, bedeckt von einem Filterpapier und einer zweiten Schaumstoffmatte. Nach dem Einbau in die Western Blot Halterung wurden die Proteine durch die Anlegung eines elektrischen Feldes von den Gelen auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Der Blot wurde auf Eis bei 120 Volt für zwei Stunden durchgeführt.

4.2.3.5 Gelfärbung

Um die restlichen, in den Gelen noch enthaltenen Proteine sichtbar zu machen, wurden sie nach dem Western Blot für 20 Minuten in der Coomassie-Färbelösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Farbstoff Coomassie färbt Proteine unspezifisch an durch die Anlagerung an basische Aminosäuren-Seitenketten. Danach wurden sie mit der Entfärbelösung, welche Methanol und Essigsäure enthält, so lange inkubiert, bis die Banden deutlich sichtbar wurden.

4.2.3.6 Antikörperfärbung

Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurden die Nitrozellulosemembranen in einer 1:2-Verdünnung von LI-COR Blocking Puffer mit PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Hierbei wird die unspezifisch Protein-bindende Membran mit Proteinen gesättigt, so dass die später verwendeten Antikörper, welche ebenfalls aus Protein bestehen, nicht unspezifisch an die Membran gebunden werden, sondern nur über die spezifische Antikörper-Antigen-Interaktion an ihr Zielprotein binden. Ausserdem werden unspezifische Bindungsstellen auf den transferierten Proteinen besetzt, so dass es zu weniger Hintergrundaktivität und somit deutlicheren Signalen kommt.

Es wurden drei verschiedene Primärantikörper verwendet, nämlich anti-c-Jun und anti-c-Myc mit anti-Aktin als Ladekontrolle und anti-Vimentin mit anti-GAPDH als Ladekontrolle.

Die Membranen wurden über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln in den Antikörperlösungen inkubiert. Danach wurden sie mit TBS-Tween einmal kurz gespült und dann dreimal für 10 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln gewaschen. Das Detergens Tween erleichtert die Entfernung ungebundener Antikörper. Anschliessend erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht die Inkubation mit den Sekundärantikörpern, welche mit Fluorochromen gelabelt waren. Da der monoklonale c-Jun-Antikörper aus Kaninchen stammt und der Aktin-Antikörper von Mäusen, wurden diese Membranen mit einem bei 800 nm fluoreszierenden Anti-rabbit-Antikörper und einem bei 680 nm fluoreszierenden Anti-mouse-Antikörper inkubiert. Entsprechend wurden für die Membranen, welche mit dem Vimentin-Antikörper gefärbt worden waren, ein Anti-mouse-Antikörper mit Fluoreszenz bei 800 nm und ein Anti-rabbit-Antikörper bei 680 nm gewählt. Die c-Myc-Membranen

wurden mit den gleichen Sekundärantikörpern wie die c-Jun-Membranen inkubiert. Vor dem Einscannen wurden die Membranen wie nach der Inkubation mit den Primärantikörpern mit TBS-Tween gewaschen und dann mit TBS abgespült, um das Tween zu entfernen.²⁹

4.2.3.7 Digitalisierung

Die Membranen wurden einzeln mithilfe eines Odyssey Scanners von LI-COR eingescannt, mit unterschiedlichen Intensitäten für optimale Bildqualitäten. Für c-Jun wurde eine Intensität von 7,5 gewählt, für Vimentin 5,0 und für c-Myc 7,0. Mithilfe der Odyssey-Software konnte die Intensität und die integrierte Intensität der Fluoreszenz-Signale analysiert werden.

4.2.4 Statistik

Alle Experimente wurden mindestens dreimal an unabhängigen Versuchstagen durchgeführt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit GraphPad Prism 5. Ermittelt wurden Mittelwerte und Standardabweichungen. Mittels ungepaartem t-Test wurden die Signifikanzwerte bestimmt, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. Die Erstellung der Diagramme erfolgte mit Excel, GraphPad Prism 5 und Paint.

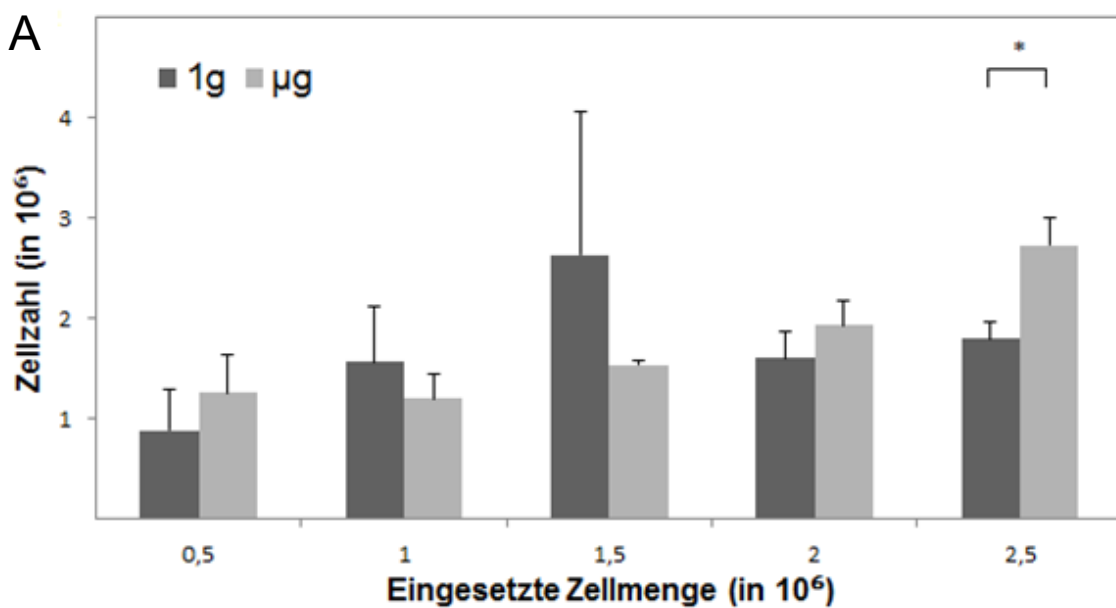
5. Ergebnisse

5.1 Vitalitätstests

Um die optimale Konzentration der U937 Zellen während Klinorotation zu finden, wurden Vitalitätstests für 24, 48 und 72 Stunden mit unstimulierten Zellen durchgeführt.

5.1.1 Vitalität der U937 Zellen nach 24 Stunden Klinorotation

Die unstimulierten Zellen wurden 24 Stunden in 10 Konzentrationen zwischen $0,5$ und 5×10^6 Zellen/ml klinorotiert und anschliessend mittels Trypanblau-Vitalitäts-Assay analysiert. Dargestellt in Abb. 8 sind ausgewählte Konzentrationen zwischen $0,5 \times 10^6$ und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml.



B

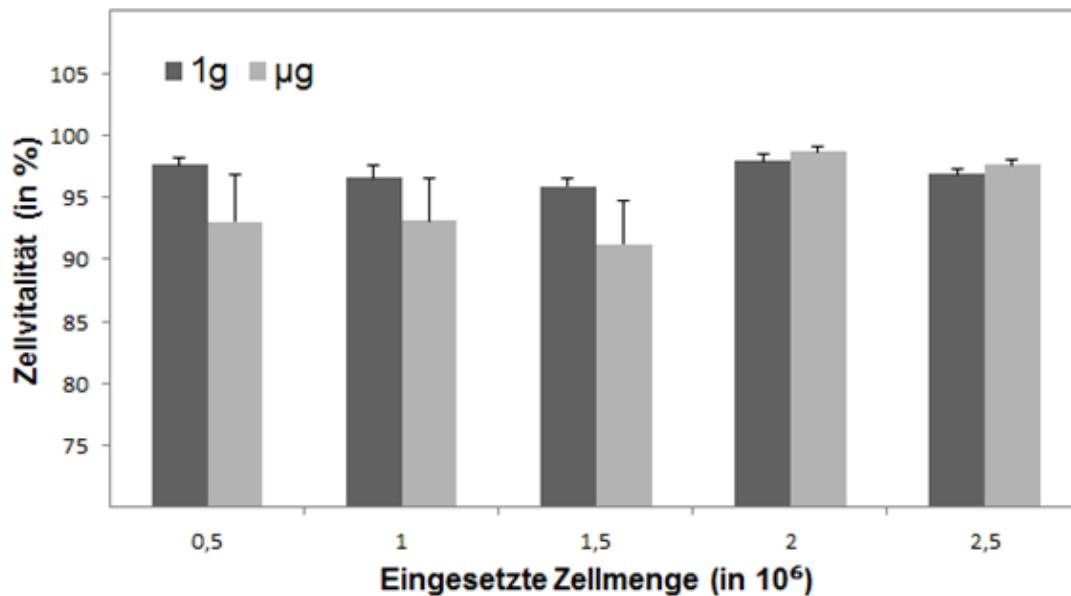


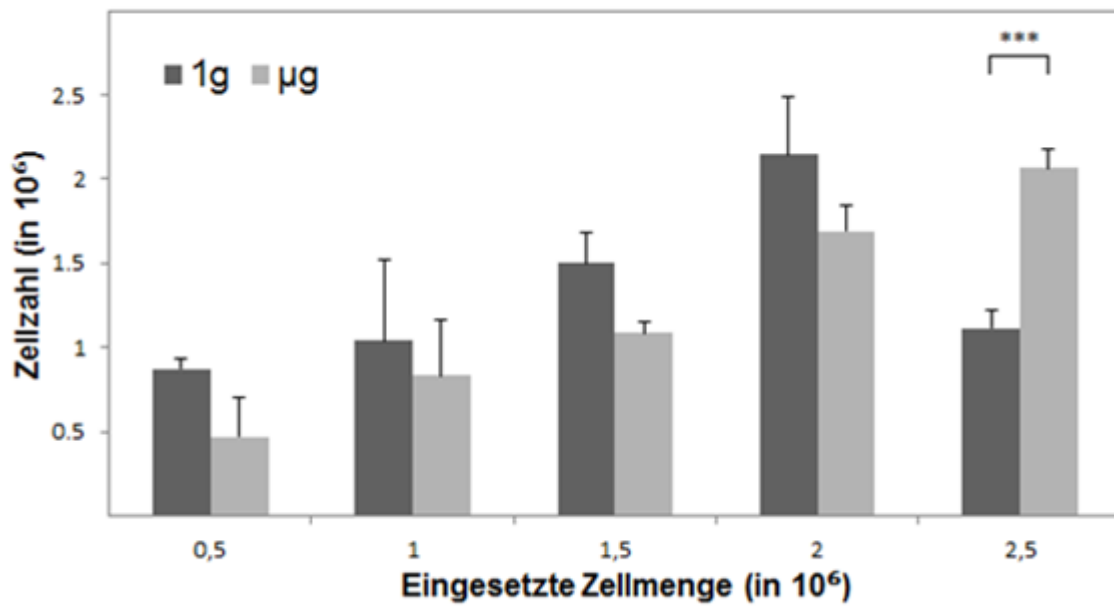
Abb. 8 Zellzahl (A) und Vitalität (B) nach 24 h Klinorotation. Eingesetzt wurden unstimulierte U937 Zellen mit einer Menge von 0,5 - 2,5 x 10⁶/ml. Bei der Zellzahl gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen 1g- und µg-Proben bei einer ursprünglichen Zellzahl von 2,5 x 10⁶ Zellen/ml, p = 0,0007 (1g: 1,113 x 10⁶ Zellen/ml +/- 0,338; µg: 2,065 x 10⁶ Zellen/ml +/- 0,117).

Dargestellt wurden Ausgangskonzentrationen zwischen 0,5 und 2,5 x 10⁶ Zellen/ml. Zwischen 0,5 - 2,0 x 10⁶ Zellen/ml steigt die Menge an geernteten Zellen kontinuierlich an, ohne signifikanten Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen 1g und µg. Ab einer Konzentration von 2,5 x 10⁶ kommt es zu einem starken Verlust an Zellen in der 1g-Kontrollgruppe. Die beste Vitalität der Zellen in beiden Gruppen (1g und µg) zeigte sich bei einer Konzentration von 2 x 10⁶ Zellen/ml (1g: 97,88% +/- 0,656; µg: 98,65% +/- 0,395).

5.1.2 Vitalität der U937 Zellen nach 48 Stunden Klinorotation

Die unstimulierten Zellen wurden 48 Stunden in 10 Konzentrationen zwischen 0,5 und 5 x 10⁶ Zellen/ml klinorotiert und anschliessend mittels Trypanblau-Vitalitäts-Assay analysiert. Dargestellt wurden Ausgangskonzentrationen zwischen 0,5 und 2,5 x 10⁶ Zellen/ml.

A



B

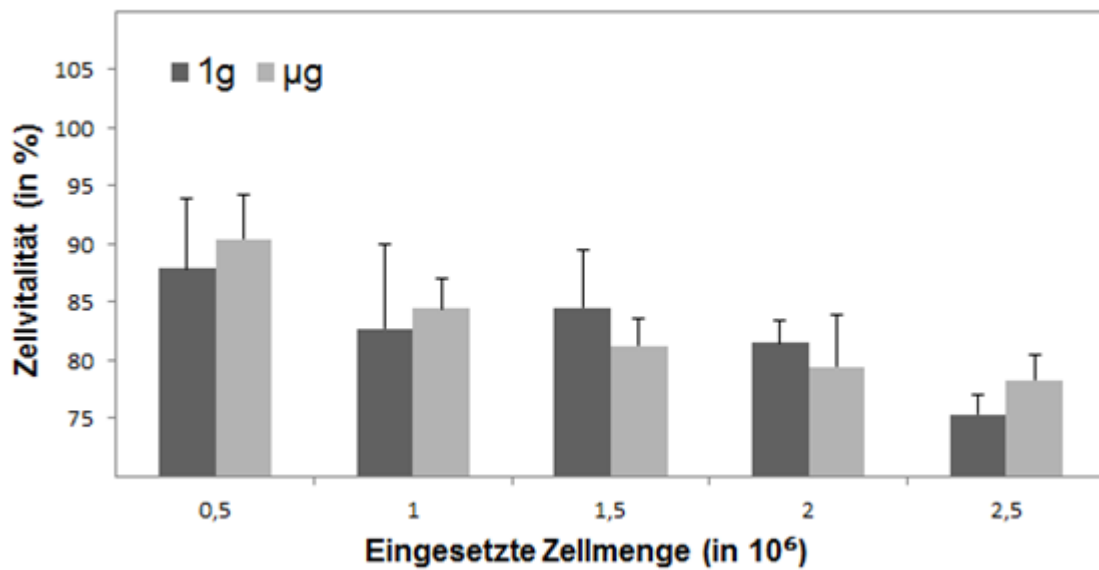
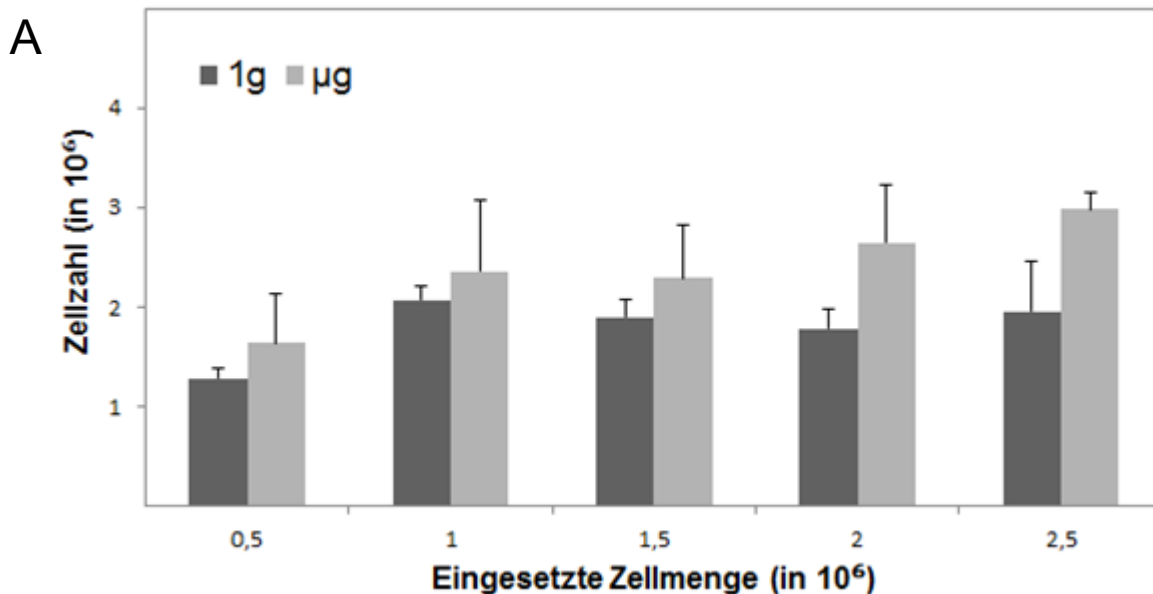


Abb. 9 Zellzahl (A) und Vitalität (B) nach 48h Klinorotation: Eingesetzt wurden unstimulierte Zellen mit einer Menge von 0,5 - 2,5 $\times 10^6$. Signifikanter Unterschied zwischen 1g- und μ g-Proben bei 2,5 $\times 10^6$ Zellen/ml, p = 0.021 (1g: 1,79 $\times 10^6$ /ml, +/- 0,178; μ g: 2,725 $\times 10^6$ Zellen/ml +/- 0,265).

Bei simulierter Mikrogravitation steigt die Menge an geernteten Zellen zwischen $0,5 - 2,5 \times 10^6$ Zellen/ml Ausgangskonzentration kontinuierlich an. Bei normaler Schwerkraft kommt es zu einem Maximum der geernteten Zellen bei $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml, um bei höheren Zellzahlen wieder abzusinken. Die Vitalität der Zellen in beiden Gruppen (1g und μ g) war bei geringeren Konzentrationen höher und zeigte sich bei Zellzahlen von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml (1g: 87,89% +/- 6,008; μ g: 90,36% +/- 3,913) und 1×10^6 Zellen/ml ähnlich gut (1g: 82,71% +/- 7,182; μ g: 84,42% +/- 2,563).

5.1.3 Vitalität der U937 Zellen nach 72 Stunden Klinorotation

Die unstimulierten Zellen wurden 72 Stunden in 10 Konzentrationen von 0,5 bis 5×10^6 Zellen/ml klinorotiert und anschliessend mittels Trypanblau-Vitalitäts-Assay analysiert.



B

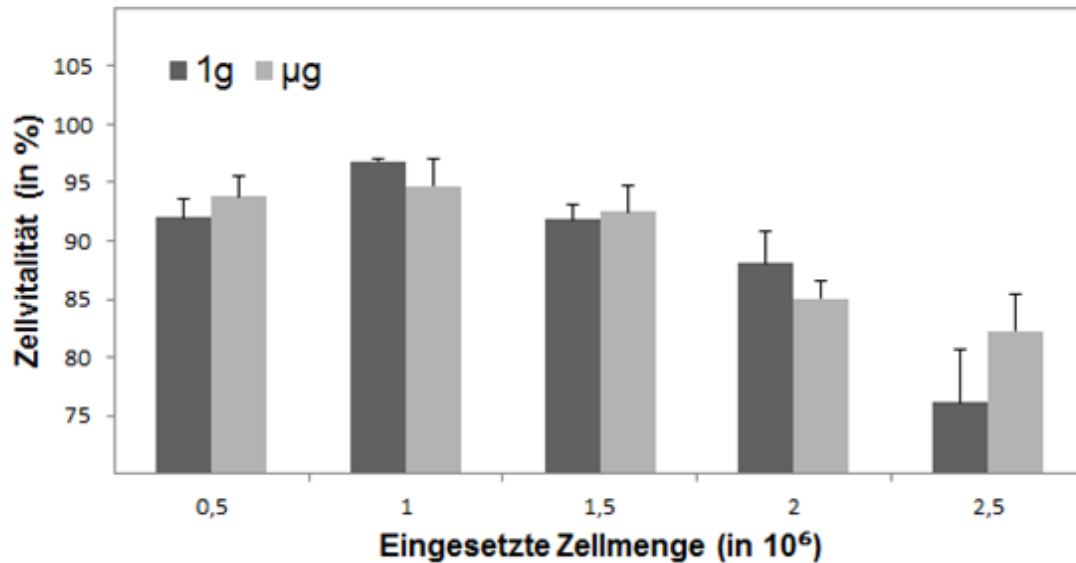


Abb. 10 Zellzahl (A) und Vitalität (B) nach 72h Klinorotation: Eingesetzt wurden unstimulierte Zellen mit einer Menge von 0,5 - 2,5 x 10⁶. Keine signifikanten Unterschiede zwischen 1g- und µg-Proben.

Dargestellt wurden Ausgangskonzentrationen zwischen 0,5 und 2,5 x 10⁶ Zellen/ml. Zwischen 0,5 und 2,0 x 10⁶ Zellen/ml steigt die Menge an geernteten Zellen kontinuierlich an ohne signifikanten Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen 1g und µg. Die beste Vitalität der Zellen in beiden Gruppen (1g und µg) zeigte sich bei einer Ausgangskonzentration von 1 x 10⁶ Zellen/ml (1g: 96,88% +/- 0,245; µg: 94,67% +/- 2,391).

5.2 Zahl und Vitalität von U937 Zellen nach 24 bis 72 Stunden Klinorotation

5.2.1 24 Stunden Klinorotation unstimulierter Zellen

Die 24 stündigen Klinostatenversuche wurden mit einer Zellzahl von 2 x 10⁶ Zellen/ml durchgeführt. Die Zellzahl und –Vitalität wurde mittels Trypanblau-Vitalitäts-Assay ermittelt.

Es konnte ein höherer Zellgehalt der µg-Proben gegenüber dem der 1g-Kontrollen beobachtet werden. Signifikant war der Unterschied bei den vitalen Zellen mit einem p-Wert = 0,03 (1g: 2.175 x 10⁶ Zellen/ml +/- 0,143; µg: 2.509 x 10⁶ Zellen/ml +/- 0,095) und bei der Gesamtzellzahl mit einem p-Wert = 0,023 (1g: 2.235 x 10⁶ Zellen/ml +/- 0,145; µg: 2,596 x 10⁶ Zellen/ml +/- 0,097). Ausserdem war die

Zellvitalität in den μg -Proben mit 96,625% \pm 0,647 tiefer als in den 1g Kontrollen mit 97,239% \pm 0,555, signifikant war dieser Unterschied jedoch nicht.

5.2.2 48 Stunden Klinorotation unstimulierter Zellen

Die 48 Stunden Klinorotation wurde mit einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml durchgeführt, Zellzahl und –Vitalität wurden mittels Trypanblau-Färbung ermittelt.

Wie bereits nach 24 Stunden, konnte auch nach 48 Stunden Klinorotation ein höherer Zellgehalt und eine höhere Zellsterblichkeit in den μg -Proben, verglichen mit den 1g-Kontrollen festgestellt werden. Signifikant war der Unterschied bei der Zahl toter Zellen mit einem p-Wert = 0,037 (1g: $0,063 \times 10^6$ Zellen/ml \pm 0,008; μg : $0,083 \times 10^6$ Zellen/ml \pm 0,007). Die Zellvitalität betrug in den 1g-Kontrollen 96,548% (\pm 0,472) und in den μg -Proben 95,83% (\pm 0,403).

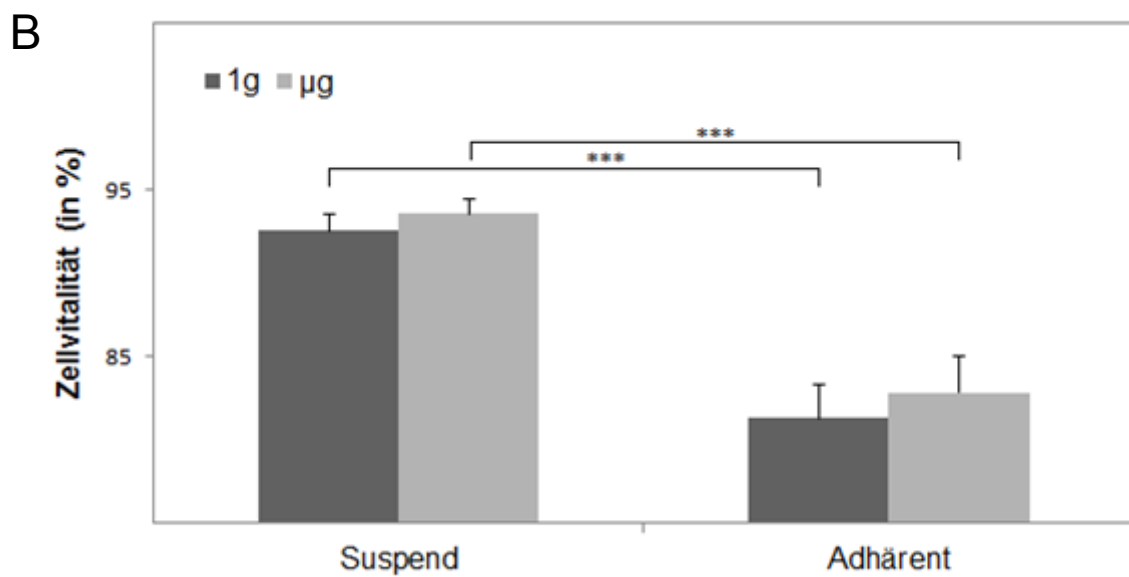
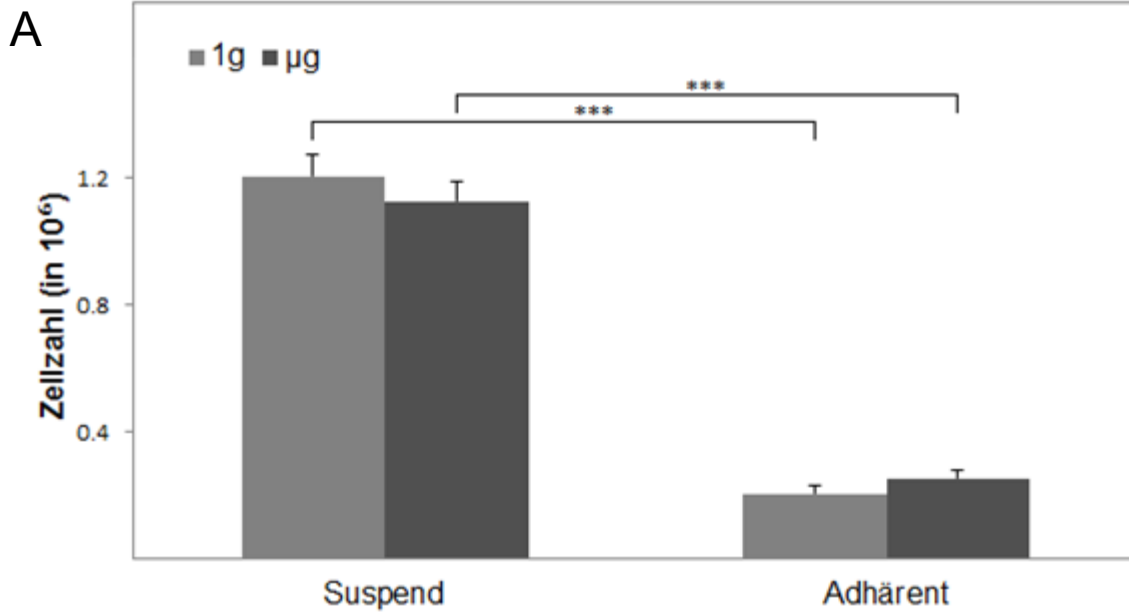
5.2.3 72 Stunden Klinorotation unstimulierter Zellen

Auch für die 72 stündigen Klinostatenversuche wurde eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml gewählt. Zellzahl und –Vitalität wurden mittels Trypanblau-Färbung ermittelt. Erneut konnte ein höherer Zellgehalt der μg -Proben gegenüber dem der 1g-Kontrollen beobachtet werden. Signifikant war der Unterschied bei der Zahl der vitalen Zellen mit einem p-Wert von 0,035 (1g: $1,737 \times 10^6$ Zellen/ml \pm 0,111; μg : $2,003 \times 10^6$ Zellen/ml \pm 0,089), bei der Zahl der toten Zellen mit einem p-Wert von 0,008 (1g: $0,086 \times 10^6$ Zellen/ml \pm 0,013; μg : $0,153 \times 10^6$ Zellen/ml \pm 0,023) und bei der Gesamtzellzahl mit einem p-Wert von 0,015 (1g: $1,823 \times 10^6$ Zellen/ml \pm 0,118; μg : $2,155 \times 10^6$ Zellen/ml \pm 0,088). Die Zellvitalität war zwar signifikant geringer in den μg -Proben als in den 1g-Proben mit einem p-Wert von 0,026, allerdings ist der Unterschied nicht sehr gross (1g: 95,404% \pm 0,525; μg : 92,81% \pm 1,172).

Im Vergleich der verschiedenen Expositionszeiten zeigte die Zellvitalität eine Abnahme mit zunehmender Rotationszeit und war ausserdem bei simulierter Mikrogravitation stets tiefer als bei normaler Schwerkraft.

5.2.4 72 Stunden Klinorotation stimulierter Zellen

Die Klinostatenversuche mit stimulierten Zellen (25 nM PMA) wurden mit einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml für 72 Stunden durchgeführt. Zellzahl, -Vitalität und -Adhärenz wurden mittels Trypanblau-Färbung ermittelt.



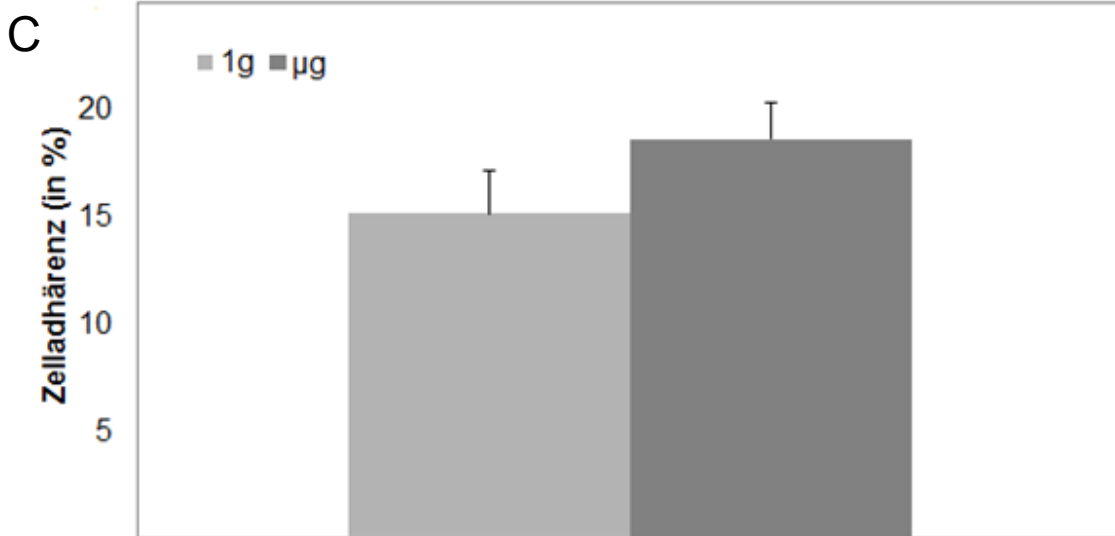


Abb. 11 Zellzahl (A), -Vitalität (B) und -Adhärenz (C) nach 72 h Klinorotation: Eingesetzt wurden stimulierte (25 nM PMA) Zellen mit einer Menge von 1×10^6 Zellen/ml. Keine signifikanten Unterschiede zwischen 1g- und µg-Proben. Signifikante Unterschiede traten zwischen suspenten und adhärenen Zellen bezüglich der Zellvitalität auf, sowohl bei den 1g-Proben, $p = 0,0002$ (suspent: 92,547% \pm 1,048; adhärenent: 81,28% \pm 2,708) als auch bei den µg-Proben, $p < 0,0001$ (suspent: 93,589% \pm 0,829; adhärenent: 82,84% \pm 2,215). Es waren signifikant mehr suspente als adhärenente Zellen in den Proben enthalten, sowohl bei den 1g-Proben, $p < 0,0001$ (suspent: $1,205 \times 10^6$ Zellen/ml \pm 0,071, adhärenent: $0,204 \times 10^6$ Zellen/ml \pm 0,0026) als auch bei den µg-Proben, $p = 0,0006$ (suspent: $1,127 \times 10^6$ Zellen/ml \pm 0,059, adhärenent: $0,253 \times 10^6$ \pm 0,024).

Im Gegensatz zu den Resultaten der Klinorotation unstimulierter Zellen konnte in den µg-Proben stimulierter (25 nM PMA) Zellen nach 72 Stunden keine erhöhte Zellzahl nachgewiesen werden. Dafür konnte in den µg-Proben, verglichen mit den 1g-Kontrollen, eine geringere Zellmortalität und ein grösserer Anteil adhärenenter Zellen beobachtet werden, diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Hoch signifikant war allerdings der Unterschied, der bezüglich der Zellvitalität zwischen suspenten und adhärenen Zellen beobachtet werden konnte. Sowohl bei den 1g-Kontrollen mit einem p-Wert von 0,0002 (suspent: 92,547% \pm 1,048; adhärenent: 81,28%, \pm 2,708) als auch bei den µg-Proben mit einem p-Wert von $< 0,0001$ (suspent: 93,589% \pm 0,829; adhärenent: 82,84% \pm 2,215) ergab sich eine deutlich geringere Vitalität der adhärenen Zellen.

5.3 Die Expression von Differenzierungsmarkern nach Klinorotation

5.3.1 c-Jun

Die c-Jun-Expression der U937 Zellen wurde nach 24, 48 und 72 Stunden Klinorotation und nach 72 Stunden Klinorotation mit simultaner Stimulation der Zellen durch 25 nM PMA mittels Western Blot ermittelt. Auf den Membranen wurde, wie in Abb. 12 dargestellt, für c-Jun eine Bande bei 39 kDa und für Aktin eine bei 42 kDa sichtbar. Das Signal des fluoreszierenden Sekundärantikörpers wurde digital quantifiziert und ebenfalls in Abb. 12 abgebildet.

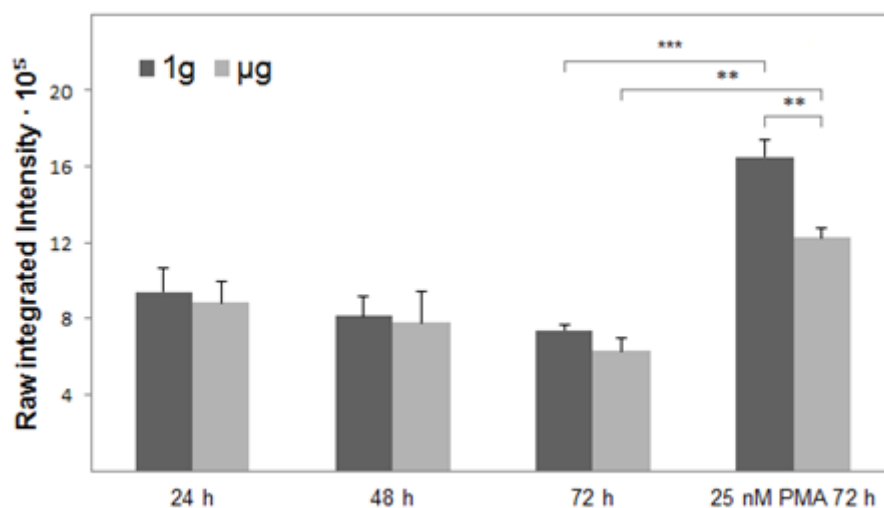
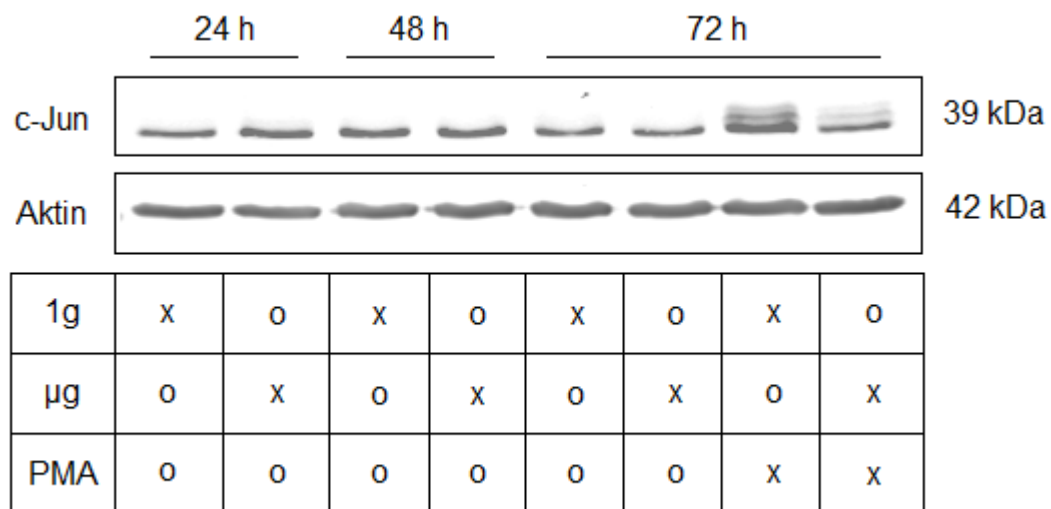


Abb. 12: Quantifizierung von c-Jun und Aktin als Ladekontrolle mittels Western Blot in unterschiedlich lang klinorotierten U937 Zellen ohne und mit PMA-Stimulation. c-Jun erscheint mit einer Bande bei 39 kDa, Aktin bei 42 kDa. Erkennbar ist eine Expressionszunahme von c-Jun unter PMA-Stimulation, sowohl in der 1g- als auch in der

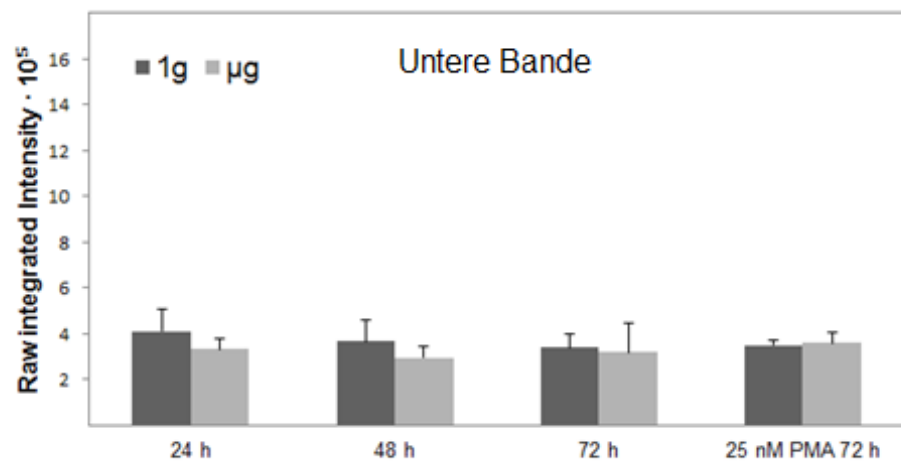
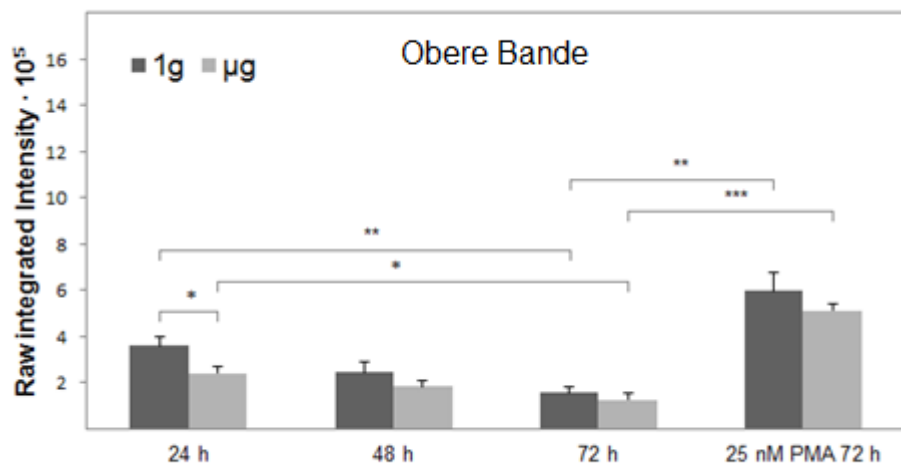
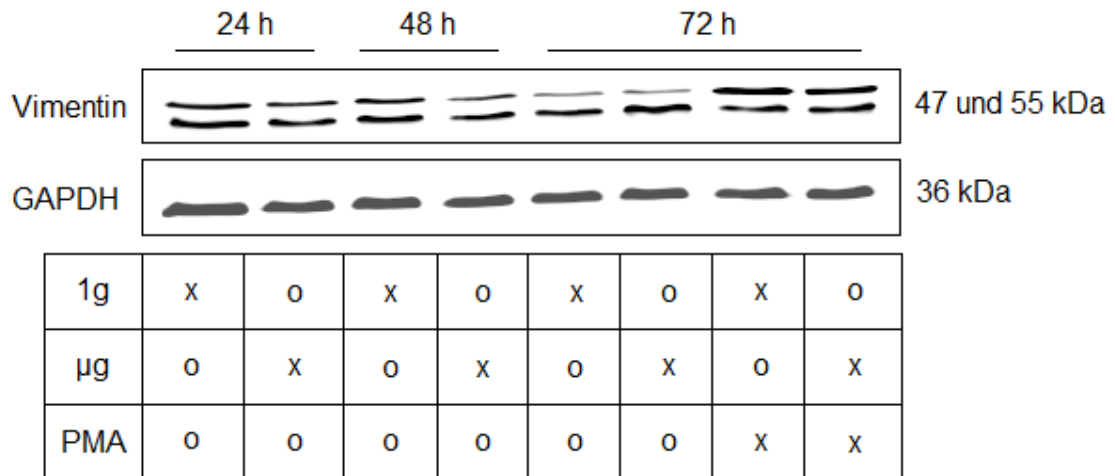
μ g-Gruppe. Aufgrund vergleichbarer Mengen in der Aktin-Kontrolle lässt sich auf eine Beladung mit gleichen Proteinmengen der Bahnen schliessen. In der digitalen Analyse stellt sich kein Unterschied der c-Jun-Menge zwischen den 1g- und μ g-Gruppen der unstimulierten Zellen nach 24 und 48 Stunden dar. Ein hoch signifikanter Anstieg der c-Jun-Expression nach PMA-Stimulation lässt sich sowohl in der 1g- wie auch in der μ g-Gruppe erkennen, bei 1g mit einem p-Wert von 0,0003 (72h ohne PMA: $7,375 \times 10^5 \pm 0,274$; 72h mit PMA: $16,524 \times 10^5 \pm 0,92$), bei μ g mit einem p-Wert von 0,0012 (72h ohne PMA: $6,284 \times 10^5 \pm 0,721$; 72h mit PMA: $12,244 \times 10^5 \pm 0,5$). Des Weiteren kommt es durch die Simulation von Schwerelosigkeit zu einer signifikant geringeren c-Jun-Expression als unter 1g mit einem p-Wert von 0,075 (1g: $16,524 \times 10^5 \pm 0,92$; μ g: $12,244 \times 10^5 \pm 0,5$).

Die digitale Quantifizierung des Fluoreszenzsignals ergab bei allen Proben eine geringfügige Suppression der c-Jun-Expression bei simulierter Schwerelosigkeit gegenüber der 1g-Kontrollgruppe. Nach 24 und 48 Stunden Klinorotation unstimulierter Zellen war der Unterschied jedoch nicht signifikant. Klinorotation für 48 Stunden erzeugt also keinen signifikanten Unterschied in der c-Jun-Expression, weder im Vergleich 1g mit μ g noch innerhalb einer Gruppe über die Zeit. Es konnte jedoch sowohl in den 1g- als auch in den μ g-Proben eine signifikante Zunahme der c-Jun-Expression nach 72 Stunden durch die Stimulation der Zellen mit PMA beobachtet werden, bei normaler Schwerkraft mit einem p-Wert von 0,0003 (72 h ohne PMA: $7,375 \times 10^5 \pm 0,274$; 72h mit PMA: $16,524 \times 10^5 \pm 0,92$) und einem p-Wert von 0,0012 bei simulierter Schwerelosigkeit (72 h ohne PMA: $6,284 \times 10^5 \pm 0,721$; 72 h mit PMA: $12,244 \times 10^5 \pm 0,5$). Zudem liess sich ein signifikanter Unterschied in der c-Jun-Expression zwischen 1g- und μ g-Gruppen PMA-stimulierter Zellen nach 72 Stunden Klinorotation nachweisen mit einem p-Wert von 0,0075 (1g: $16,524 \times 10^5 \pm 0,92$; μ g: $12,244 \times 10^5 \pm 0,5$). Die Aktin-Kontrolle zeigt ein gleichmässiges Signal in allen Spuren und lässt so auf eine gleichmässige Beladung der Bahnen schliessen.

5.3.2 Vimentin

Die Vimentin-Expression der U937 Zellen wurde nach 24, 48 und 72 Stunden Klinorotation und nach 72 Stunden Klinorotation mit gleichzeitiger Stimulation der Zellen durch 25 nM PMA mittels Western Blot ermittelt. Das Signal des fluoreszierenden Sekundärantikörpers wurde digital quantifiziert. In Abb. 13 wurden

sowohl die Banden von Vimentin und GAPDH wie auch die digitale Auswertung dargestellt.



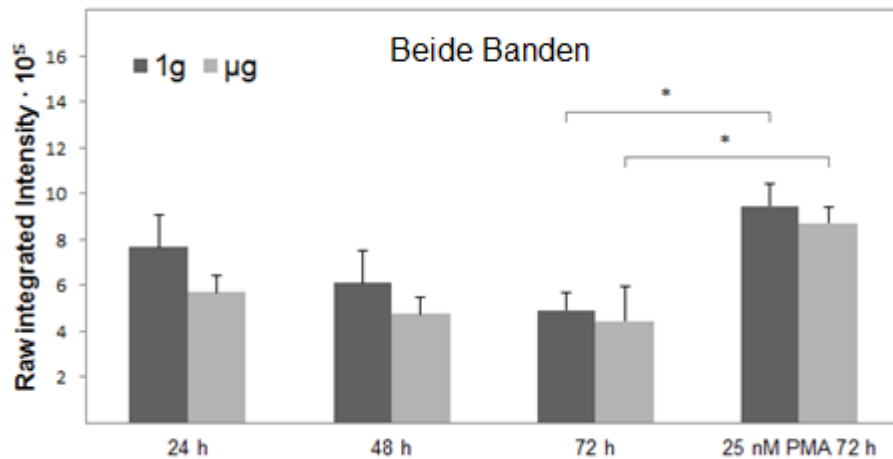


Abb. 13: Quantifizierung von Vimentin und GAPDH als Ladekontrolle mittels Western Blot in unterschiedlich lang klinorotierten U937 Zellen ohne und mit PMA-Stimulation. Vimentin erscheint mit einer Bande bei 55 kDa und einer wahrscheinlich einer Kreuzreaktion mit einem verwandten Protein entsprechenden Bande bei 47 kDa, GAPDH bei 36 kDa. Erkennbar ist eine Expressionsabnahme von Vimentin in der oberen Bande (55 kDa) mit der Rotationszeit und eine Zunahme unter PMA-Stimulation, sowohl in den 1g-, als auch in den µg-Gruppen. Bei fehlenden Unterschieden in der GAPDH-Kontrolle lässt sich auf eine Beladung der Bahnen mit gleichen Proteinmengen schließen.

In der digitalen Analyse zeigten sich in der unteren Vimentin-Bande (47 kDa) keine signifikanten Unterschiede zwischen den 1g- und den µg-Gruppen. In der oberen Bande (55 kDa) stellt sich eine signifikante Expressionsabnahme von Vimentin durch simulierte Schwerelosigkeit nach 24 Stunden Klinorotation dar mit einem p-Wert von 0,0397 (1g: $3,575 \times 10^5 \pm 0,424$; µg: $2,388 \times 10^5 \pm 0,278$). Des Weiteren kommt es zu einer Abnahme der Vimentinexpression mit steigender Expositionszeit sowohl bei 1g, wie auch bei µg. Der Unterschied ist signifikant zwischen 24 und 72 Stunden mit einem p-Wert von 0,0076 bei 1g (24 h: $3,575 \times 10^5 \pm 0,424$; 72 h: $1,542 \times 10^5 \pm 2,63$), bei µg mit einem p-Wert = 0,0246 (24 h: $2,388 \times 10^5 \pm 0,278$; 72 h: $1,231 \times 10^5 \pm 0,307$). Ein signifikanter Anstieg der Vimentin-Expression durch PMA-Stimulation lässt sich sowohl in der 1g, wie auch in der µg Gruppe erkennen. Bei 1g mit einem p-Wert von 0,0036 (72 h: $1,542 \times 10^5 \pm 0,263$; 72 h + PMA: $5,958 \times 10^5 \pm 0,83$), bei µg mit einem p-Wert von 0,0003 (72 h: $1,231 \times 10^5 \pm 0,307$; 72 h + PMA: $5,121 \times 10^5 \pm 0,265$).

Auf den Membranen wurden für Vimentin zwei Banden sichtbar, eine bei 55 kDa, welche dem gesuchten Protein mit einer Molekülmasse von 58 kDa entspricht und eine bei 47 kDa, welche am ehesten als Kreuzreaktion mit einem Vimentin-

verwandten Protein angesehen werden muss. Für GAPDH fand sich eine Bande bei 36 kDa. In der oberen Vimentin-Bande (55 kDa) konnten eine Abnahme der Expression mit zunehmender Klinorotationszeit sowie eine Zunahme durch die Stimulation der Zellen durch PMA beobachtet werden. In der unteren Vimentin-Bande (47 kDa) waren keine Unterschiede zu erkennen. Die gleichmässigen Fluoreszenzsignale in der GAPDH-Kontrolle liessen auf eine gleichmässige Beladung der Bahnen schliessen.

Die digitale Quantifizierung des Fluoreszenzsignals ergab keine signifikanten Unterschiede in der unteren Vimentin-Bande (47 kDa). In der oberen Bande (55 kDa) wurde in allen Proben eine Suppression der Vimentin-Expression bei simulierter Schwerelosigkeit gegenüber den Kontrollen beobachtet. Nach 48 und 72 Stunden Klinorotation unstimulierter Zellen, sowie nach 72 Stunden Klinorotation stimulierter Zellen war der Unterschied jeweils im Vergleich zu den 1g-Kontrollen nicht signifikant. Eine Signifikanz der Expressionsabnahme durch simulierte Schwerelosigkeit konnte bei 24 Stunden Klinorotation unstimulierter Zellen im Vergleich zur 1g-Kontrolle nachgewiesen werden mit einem p-Wert von 0,0397 (1g: $3,575 \times 10^5 \pm 0,424$; μg : $2,388 \times 10^5 \pm 0,278$). Ausserdem liess sich eine Expressionsabnahme in der oberen Vimentin-Bande (55 kDa) mit steigender Expositionszeit nachweisen, sowohl bei normaler Schwerkraft wie auch bei simulierter Schwerelosigkeit. Signifikant war dieser Unterschied zwischen 24 und 72 Stunden Experimentzeit unstimulierter Zellen bei 1g mit einem p-Wert von 0,0076 (24 h: $3,575 \times 10^5 \pm 0,424$; 72 h: $1,542 \times 10^5 \pm 2,63$) und bei Klinorotation mit einem p-Wert von 0,0246 (24 h: $2,388 \times 10^5 \pm 0,278$; 72 h: $1,231 \times 10^5 \pm 0,307$). Des Weiteren kommt es zu einer signifikanten Zunahme der Vimentin Expression in der oberen Bande (55 kDa) durch die Stimulation der Zellen mit PMA, sowohl bei 1g mit einem p-Wert von 0,0036 (72 h ohne PMA: $1,542 \times 10^5 \pm 0,263$; 72 h mit PMA: $5,958 \times 10^5 \pm 0,83$), wie auch bei μg mit einem p-Wert von 0,0003 (72 h ohne PMA: $1,231 \times 10^5 \pm 0,307$; 72 h mit PMA: $5,121 \times 10^5 \pm 0,265$).

5.3.3 c-Myc

Die c-Myc-Expression der U937 Zellen wurde nach 24, 48 und 72 Stunden Klinorotation und nach 72 Stunden Klinorotation mit gleichzeitiger Stimulation der Zellen durch 25 nM PMA mittels Western Blot ermittelt. Das Signal des

fluoreszierenden Sekundärantikörpers wurde digital quantifiziert. Die Western Blot-Banden, wie auch die digitale Analyse wurden in Abb. 14 dargestellt.

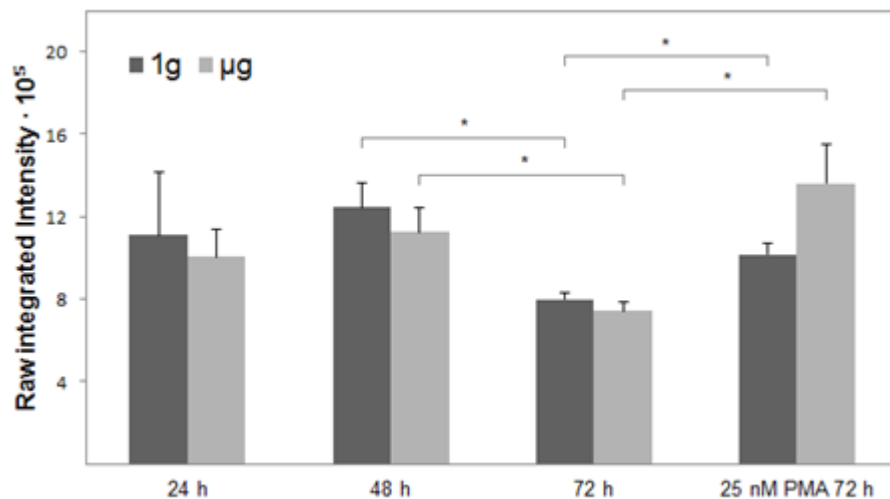
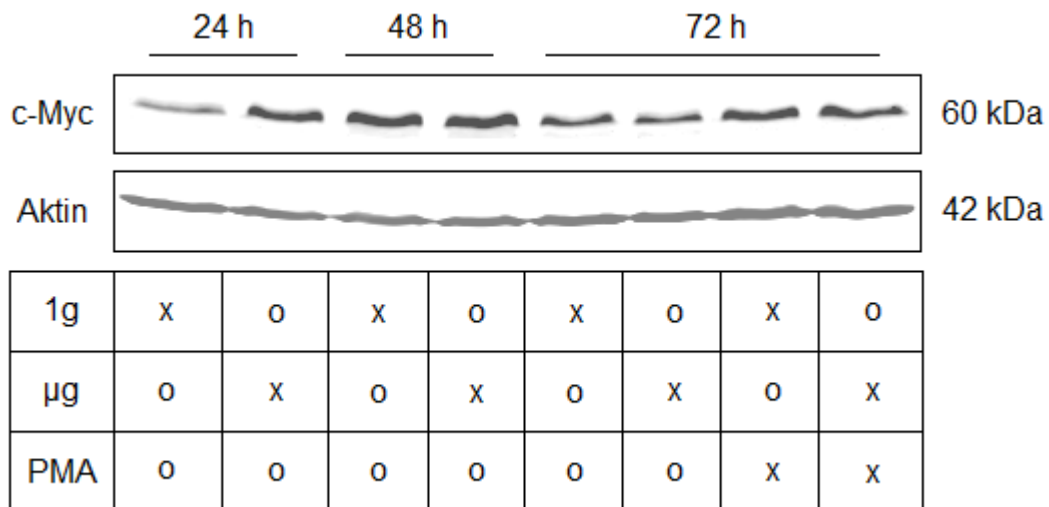


Abb. 14: Quantifizierung von c-Myc und Aktin als Ladekontrolle mittels Western Blot in unterschiedlich lang klinorotierten U937 Zellen ohne und mit PMA-Stimulation. c-Myc erscheint mit einer deutlichen Bande bei 60 kDa, Aktin bei 42 kDa. Erkennbar ist eine Expressionszunahme von c-Myc unter PMA-Stimulation, sowohl in der 1g-, als auch in der µg-Gruppe. Aufgrund vergleichbarer Mengen in der Aktin-Kontrolle, lässt sich auf eine Beladung der Bahnen mit gleichen Probenmengen schliessen. In der digitalen Analyse stellt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den 1g- und den µg-Gruppen dar. Ein signifikanter Anstieg der c-Myc-Expression durch PMA-Stimulation lässt sich sowohl in der 1g-, als auch in der µg-Gruppe erkennen. Bei 1g mit einem p-Wert von 0,0125 (72 h: $7,981 \times 10^5 \pm 0,333$; 72 h + PMA: $10,163 \times 10^5 \pm 0,528$), bei µg mit einem p-Wert von 0,017 (72 h: $7,417 \times 10^5 \pm 0,448$; 72 h + PMA: $13,598 \times 10^5 \pm 1,90$). Des Weiteren kommt es zu einer Abnahme der c-Myc-Expression zwischen 48 und 72

Stunden Klinorotation. Bei 1g mit einem p-Wert von 0,011 (48 h: $12,456 \times 10^5 \pm 1,187$; 72 h: $7,981 \times 10^5 \pm 0,333$), bei μg mit einem p-Wert von 0,0197 (48 h: $11,257 \times 10^5 \pm 1,193$; 72 h: $7,417 \times 10^5 \pm 0,448$).

Auf den Membranen wurde für c-Myc eine Bande bei 60 kDa und für Aktin eine bei 42 kDa sichtbar. Die digitale Quantifizierung des Fluoreszenzsignals ergab bei allen Proben mit nicht stimulierten Zellen keine Veränderung der c-Myc-Expression bei simulierter Schwerelosigkeit gegenüber den Kontrollen. Bei stimulierten Zellen unter simulierter Schwerelosigkeit kam es zwar zu einer sichtbaren Erhöhung im Expressionslevel von c-Myc im Vergleich zu der 1g-Kontrolle, aufgrund der hohen Standardabweichung liess sich jedoch keine Signifikanz nachweisen. Ausserdem fiel sowohl in der 1g- als auch in der μg -Gruppe ein signifikanter Anstieg der c-Myc-Expression durch die Stimulation der Zellen mit PMA während 72 Stunden Experimentzeit, beziehungsweise Klinorotation auf, bei normaler Schwerkraft mit einem p-Wert von 0,0125 (72 h ohne PMA: $7,981 \times 10^5 \pm 0,333$; 72h mit PMA: $10,163 \times 10^5 \pm 0,528$) und einem p-Wert von 0,017 bei simulierter Schwerelosigkeit (72 h ohne PMA: $7,417 \times 10^5 \pm 0,448$; 72 h mit PMA: $13,598 \times 10^5 \pm 1,90$). Die Aktin-Signalintensitäten zeigten keine Unterschiede zwischen den Proben und liessen so auf eine gleichmässige Beladung der Bahnen schliessen.

Zwischen 48 und 72 Stunden Klinorotation konnte zudem eine Abnahme der c-Myc Expression beobachtet werden, bei 1g mit einem p-Wert = 0,011 (48 h: $12,456 \times 10^5 \pm 1,187$; 72 h: $7,981 \times 10^5 \pm 0,333$), bei μg mit einem p-Wert = 0,0197 (48 h: $11,257 \times 10^5 \pm 1,193$; 72 h: $7,417 \times 10^5 \pm 0,448$).

6. Diskussion

Durch die Erdanziehungskraft herrscht auf unserem Planeten eine nahezu konstante Schwerkraft. Fällt diese gewohnte Kraft auf den menschlichen Körper weg, wie dies bei der bemannten Raumfahrt der Fall ist, kommt es zu diversen Veränderungen. Zu den betroffenen Funktionssystemen des menschlichen Körpers zählen unter anderem das Immunsystem, das muskuloskelettale und das kardiovaskuläre System.¹⁸ Im Detail kommt es unter anderem zu einer verminderten Aktivität des Immunsystems und damit zu einer erworbenen Immunschwäche, zur Knochendemineralisierung, welche zu einer frühzeitigen Osteoporose führt, zu einer Muskelatrophie, die über eine Inaktivitätsatrophie hinaus geht, eine allgemeine Dekonditionierung und orthostatische Intoleranz.¹⁸ Diese Multisystemveränderungen bedingen eine ursachenbasierte Erforschung und Kontrolle, bevor es möglich wird, Astronauten ungefährdet auf längere Raumfahrtmissionen wie z.B. zum Mars schicken zu können.

Das durch den Raumflug hervorgerufene erworbene Immundefizit gründet unter anderem auf einer verminderten Funktion von neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, natürlichen Killerzellen und Monozyten und resultiert in einer Tendenz zu opportunistischen Infektionen, schweren und generalisierten Verläufen von Infektionskrankheiten und Reaktivierungen latenter Infektionen.^{19; 21}

In Bezug auf das in dieser Arbeit benutzte Zellsystem ist in der vorherrschenden Literatur noch nicht viel Kausales beschrieben. Von Meehan et al. konnte gezeigt werden, dass die Monozytenzahl nach Raumflügen von bis zu fünf Tagen anstieg, um danach wieder abzufallen. Die zugrundeliegende Ursache ist derzeit noch nicht bekannt. Die Proben für diese Analysen wurden jeweils vor und nach einer Mission gewonnen, über die Verhältnisse während der eigentlichen Schwerelosigkeit kann somit nur indirekt rückgeschlossen werden. Ausserdem unterliegen die Werte starken individuellen Schwankungen.^{21; 24}

In Bezug auf die Funktion wurden von Kaur et al. 2005 folgende Veränderungen beschrieben: Eine verminderte Phagozytose-Kapazität, eine reduzierte oxidative Burst Antwort, sowie eine eingeschränkte Degranulation bei Bindung des Fc-Rezeptors.²¹ Es fiel zudem eine verminderte Expression von Komponenten des Fcγ-Rezeptors und von CD14 auf. Beide spielen eine wichtige Rolle für die Erkennung

und Phagozytose von Erregern.²⁵ Zudem produzierten die Monozyten nach Raumflügen vermehrt das antiinflammatorische Zytokin IL-1ra zu Lasten von IL-1 β , welches eine Entzündungsreaktion und die Transkription von IL-6 und IL-8 stimuliert.²⁵ Insgesamt resultiert ein eingeschränkter Schutz durch das Monozyten Makrophagen Systems vor Infektionen.^{21; 25}

2011 konnte unsere Arbeitsgruppe im Rahmen der Raketen-Mission TEXUS-49 anhand von Gen-Arrays Schwerkraftabhängige Veränderungen der Genexpression von Monozyten anhand der Zelllinie U937 identifizieren. Es fanden sich Veränderungen in Genen der Zellzyklusregulation, des p53-Systems, sowie des Proteasoms.³⁰ Im November 2011 wurden wiederum Zellen der Zellreihe U937 nach mehrtägiger Exposition gegenüber verminderter Schwerkraft auf der chinesischen Raumstation Shenzhou 8 untersucht. Diese Langzeit-Daten wiesen Störungen des Actin-Zytoskeletts auf wie auch eine verminderte Expression von CD86 und ICAM-1 bei differenzierten Zellen.³¹ Im Rahmen der 19. Parabelflugkampagne des deutschen Zentrums für Luft- und Raumfahrt wurden 2012 die gleichen Zellen bezüglich ihrer Genexpression nach kurzzeitiger Mikrogravitations-Exposition untersucht.³² Durch die Kombination der Resultate dieser drei Studien mit unterschiedlichen Modellen zur Erzeugung von Schwerelosigkeit entstand ein einzigartiger Überblick über die Mikrogravitationsinduzierten Veränderungen des Monozyten-Makrophagen Systems nach unterschiedlich langer Expositionszeit.³²

Ein entscheidender Schritt zur Ausreifung eines Makrophagen ist die Einwanderung und Differenzierung des Monozyten an den Ort des Geschehens. Während dieses Differenzierungsprozesses kommt es zu Expressionsveränderungen wichtiger Signalproteine, an welchen man den Differenzierungsprozess beobachten und bewerten kann. Dazu zählen unter anderem c-jun, c-myc und Vimentin. In dieser Arbeit wurde die Expression ebendieser Signalproteine in monozytären U937 Zellen nach unterschiedlich langer Exposition gegenüber simulierter Schwerelosigkeit, mit und ohne Stimulation der Zellen durch PMA analysiert. Das Ziel war es, festzustellen, ob es durch die Mikrogravitation zu einer Veränderung des monozytären Differenzierungsverhaltens kommt.

c-Jun reguliert als Bestandteil des AP-1 die Transkription diverser Gene, welche in der Regulierung von Proliferation, Apoptose und Zelldifferenzierung eine Rolle spielen.⁶ Die c-Jun-Aktivität wird durch die PKC über die MAP-Kinase- JNK stimuliert.⁶ Vimentin dient als Intermediärfilament insbesondere der mechanischen

Stabilität und Widerstandsfähigkeit von Zellen, die besonders belastet werden, wie das bei migrierenden Makrophagen der Fall ist. Die mehrfach verdrehten Monomere weisen eine hohe Reißfestigkeit auf und können starken Spannungen standhalten. Da Vimentin ausschließlich in mesenchymalen Zellen (wie zum Beispiel Granulozyten) vorkommt und seine Expression während der monozytären Differenzierung erhöht ist, eignet er sich sehr gut als Differenzierungsmarker.^{2; 8}

Als Protoonkogen induziert c-Myc die Transkription diverser Zellzyklus-regulierender Gene.^{9;---10} Zudem ist es an der Regulation der Zelldifferenzierung während der monozytären und granulozytären Zellreifung beteiligt und wird während der Differenzierung weniger exprimiert.¹²

Als *in vitro* Modell der humanen Monozyten benutzten wir die Tumorzelllinie U937; diese immortale monozytäre Zelllinie hat sich diverse Eigenschaften primärer Zellen bewahrt. So ist sie in der Lage, durch Inkubation mit verschiedenen Substanzen wie unter Anderem das Thiophorbolester PMA zu Makrophagen ausdifferenziert zu werden, Partikel zu phagozytieren und immunrelevante Oberflächenmarker zu exprimieren.^{4; 13} Durch den Differenzierungsprozess ändern die Zellen ihre Form. Aus runden, suspenden Zellen mit glatter Oberfläche werden flache, weit ausgebreitete Zellen mit Pseudopodien, welche die Zellteilung einstellen sowie Zellcluster zu formen und an Oberflächen zu adhären beginnen.^{4; 13} Um den Zustand der Schwerelosigkeit auf der Erde zu reproduzieren, muss der Gravitationsvektor ausgeschaltet werden. Hierfür wurden verschiedene Modelle entwickelt. Der Parabelflug beispielsweise generiert mittels parabolischer Flugmanöver 22 Sekunden Mikrogravitation, in welchen Experimente durchgeführt werden können.²⁶ Für *in vitro* Versuche im Labor, welche gut reproduzierbar und multipel wiederholbar sind, hat sich der Klinostat als Simulator bewährt. Durch die konstante Rotation um seine eigene Achse wird die intrazelluläre Sedimentation von schwereren Partikeln verhindert, so dass diese stattdessen homogen im Zytosol verteilt werden. Durch diesen Mechanismus entsteht auf zellulärer Ebene der Eindruck von Schwerelosigkeit.^{26; 28} Die Vergleichbarkeit von Resultaten aus *in vitro* Studien mit Ergebnissen von Studien, die mit Proben von Astronauten nach realen Raumflügen durchgeführt wurden, ist kritisch zu betrachten. Einerseits handelt es sich bei der Mikrogravitation, die der Klinostat generiert, um eine Simulation und keine wirkliche Schwerelosigkeit, andererseits wirken während eines Raumfluges sehr viel mehr Stressoren auf den Menschen ein als die Schwerelosigkeit.²¹ Die Vorteile, die ein

Klinostat bietet, sind die relativ einfache Verfügbarkeit sowie die uneingeschränkte Wiederholbarkeit der Experimente, was sich in der Vorbereitung grösserer Kampagnen bewährt hat. Aufgrund dieser Vorteile erwies sich der Klinostat als hervorragendes Modellsystem für die Untersuchung der Mikrogravitations-induzierten Veränderungen der Signalwege der monozytären Zelllinie U937.

Um sicher zu stellen, dass der Hauptanteil der analysierten Zellen vital war, bevor sie terminiert wurden, wurden im Voraus zu den Experimenten Vitalitätsanalysen mit den Zellen durchgeführt. Dabei ging es darum, sowohl vitale Zellen als auch möglichst viele Zellen pro untersuchter Gruppe zu erhalten, um ein repräsentatives Bild im Immunoblot darstellen zu können. Die Zellen wurden in Konzentrationen von $0,5$ bis 5×10^6 Zellen/ml für 24, 48 und 72 Stunden klinorotiert, beziehungsweise zur Kontrolle in der Klinorotations-Hardware nur inkubiert. Nach 24 Stunden Experimentphase wiesen die Zellen in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml die höchste Zellvitalität auf, dies in der 1g-Kontrolle, wie auch in der μg -Gruppe. Sowohl bei höheren als auch bei geringeren Zellkonzentrationen überlebten weniger Zellen. Dieser Effekt dürfte darauf zurückzuführen sein, dass die Zellen einerseits auf ausreichende Nährstoffversorgung angewiesen sind, andererseits aber auch interzelluläre Kontakte als Wachstumsstimulation benötigen.

Nach 48 stündiger Experimentzeit lag die Vitalität deutlich tiefer als nach 24 Stunden, was zumindest partiell mit einer beginnenden Substratknappheit erklärt werden könnte. Da das Überleben bei $0,5$ und 1×10^6 Zellen/ml ähnlich war, wurde der grösseren Proteinausbeute wegen die höhere Zellzahl als Versuchszellzahl in den weiteren Experimenten festgelegt.

Nach 72 Stunden Klinorotation zeigte sich wieder ein klares Maximum der Zellvitalität bei 1×10^6 Zellen/ml mit einem Abfall sowohl bei tieferen, als auch bei höheren Konzentrationen. Folglich wurde diese Zellzahl als Standard für die 72 Stunden-Klinostatenversuche mit unstimulierten Zellen definiert.

Es zeigte sich ausserdem für alle Ausgangskonzentrationen eine stärkere Proliferation der Zellen in den klinorotierten Proben als in den 1g-Kontrollen. Dieser Effekt trat auch in den im Anschluss durchgeführten Klinostatenversuchen wieder auf und wird dort diskutiert. Zusammenfassend wurde die eingesetzte Zellmenge für die 24 Stunden-Versuche auf 2×10^6 Zellen, für die anderen Experimentzeiten auf 1×10^6 Zellen festgelegt.

Bei der Klinorotation unstimulierter Zellen fielen höhere Zellzahlen in den μ g-Gruppen als in den 1g-Kontrollen auf, der Unterschied wurde mit steigender Expositionszeit deutlicher und nach 72 Stunden signifikant. Als Ursache für dieses Resultat ist von einer geringeren Kontaktinhibierung der Zellteilung bei simulierter Schwerelosigkeit als bei normaler Schwerkraft auszugehen. Sedimentieren die Zellen, wie dies bei normaler Schwerkraft der Fall ist, führen die interzellulären Kontakte zu einer Hemmung der Zellteilung. Durch die freie Bewegung und homogene Verteilung der Zellen im Medium bei simulierter Schwerelosigkeit kommt dieser hemmende Einfluss weniger zum Tragen. Ebenfalls durch die Sedimentierung könnte der Zugang zu den im Medium enthaltenen Nährstoffen eingeschränkt werden, was ebenfalls eine geringere Zellteilung erklären könnte.

In der Literatur wird ein Anstieg der Monozytenzahl bei Astronauten nach kurzen Raumflügen von bis zu fünf Tagen beschrieben.^{21; 24} Der Monozyten-Anstieg war jedoch nur nach kurzen Aufenthalten in schwerelosiger Umgebung zu beobachten, bei längerer Exposition wurden normale Monozyten-Zahlen beschrieben. Aufgrund dessen wurde ein Effekt der Gravitationsveränderung und nicht der Gravitationsverminderung als Ursache diskutiert.²¹ Derselbe Effekt könnte auch für die hier festgestellte höhere Zellzahl bei simulierter Schwerelosigkeit im Vergleich zu normaler Schwerkraft verantwortlich sein.

Der in den Versuchen mit unstimulierten Zellen nachgewiesene Effekt von höheren Zellzahlen bei simulierter Mikrogravitation konnte bei simultaner Stimulation der Zellen mit 25 nM PMA nicht reproduziert werden. Der Anteil differenzierter, adhärenter Zellen unterschied sich zwischen der 1g-Kontrolle und der μ g-Gruppe nicht signifikant. Signifikant war jedoch die geringere Zellvitalität bei adhärenenten verglichen mit suspenten Zellen, sowohl in der 1g-Kontrolle als auch in der μ g-Gruppe. Dies könnte zumindest partiell daran liegen, dass differenzierte, also adhärente monozytäre Zellen, zum Teil auch wenn sie vital sind, Trypanblau aufnehmen - und so fälschlicherweise als tot gezählt werden können.³³

Die Wirkung von PMA basiert auf der Aktivierung der PKC, wodurch sie die runden und suspenten, monozytären Zellen zur Differenzierung zu adhärenenten, Pseudopodien-bildenden Zellen stimuliert.¹³ Mit der Differenzierung geht ein Verlust der Proliferationsfähigkeit einher.⁴ Ausserdem hat PMA auch eine proapoptotische Partialwirkung, somit werden monozytäre Zellen, welche mit PMA inkubiert wurden, entweder differenzieren oder absterben. Die höhere Zellsterblichkeit bei adhärenenten

Zellen, verglichen mit der bei suspenten, erklärt sich möglicherweise also durch die Doppelwirkung von PMA mit gleichzeitiger Induktion von Differenzierung – gemessen anhand der Adhärenz – und Apoptose. Es gilt allerdings zu berücksichtigen, dass die adhärennten und suspenten Zellen unterschiedlich behandelt wurden - nur die adhärennten Zellen wurden, um sie von der Oberfläche zu lösen, mit EDTA inkubiert. Ausserdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Proben mit adhärennten Zellen auch Reste suspenter enthielten.

Um den Einfluss der simulierten Mikrogravitation auf die Differenzierungsfähigkeit der monozytären Zellen zu untersuchen, wurde mittels Immunoblot die Expression von drei myeloischen Differenzierungsmarkern analysiert. Die Resultate für c-Jun, Vimentin und c-Myc werden im Folgenden einzeln besprochen.

c-Jun ist als Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1 relevant an der Regulation von Genen der Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt.⁶ Verschiedene extrazelluläre Stimuli regulieren die c-Jun-Transkription, wie auch dessen Stabilität über die Aktivität der JNK. AP-1 wiederum reguliert unter anderem Gene, welche die Proliferation von Fibroblasten, die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und die Apoptose regulieren.⁷ Die Western Blot Analyse des Differenzierungsmarkers c-Jun wies eine deutliche Bande bei 39 kDa auf, deren Signal in den mit PMA stimulierten Proben stärker ausgeprägt war. In der digitalen Quantifizierung des Fluoreszenzsignals zeigte sich eine geringere c-Jun-Expression in den μ g-Gruppen als in den 1g-Kontrollen und eine höhere in den mit PMA stimulierten Proben, sowohl unter 1g-, als auch unter μ g-Bedingungen. Beide Veränderungen waren signifikant. Die gesteigerte c-Jun-Expression bei mit PMA stimulierten Zellen ist als direkter Effekt von PMA zu verstehen, es führt über die Aktivierung der PKC zu einer Phosphorylierung und somit Aktivierung der JNK.¹⁴ Die aktivierte JNK phosphoryliert c-Jun an zwei Serin-Resten, nämlich 63 und 73. Dies führt zu einer Steigerung der Stabilität und Aktivität von c-Jun.^{6; 7}

Die signifikant geringere c-Jun-Expression nach 72 Stunden Klinorotation stimulierter Zellen in der μ g-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen ist schwierig in die bestehende Literatur einzureihen und einem bestimmten Mechanismus zuzuordnen, einerseits, da die c-Jun-Wirkung durch die Transkriptionsregulation als Teil des AP-1 sehr vielfältig ist^{6; 7}, andererseits, da über den Effekt von Mikrogravitation auf Monozyten noch relativ wenig bekannt ist. Hinzu kommt, dass die Vergleichbarkeit

von *in vitro* Studien mit Studien an biologischem Material aus schwerelosere Umgebung grundsätzlich zu hinterfragen ist.²¹

Der ebenfalls untersuchte Marker der myeloischen Zelldifferenzierung, Vimentin, ist ein Intermediärfilament. Es dient der Stabilität und Widerstandsfähigkeit der Zellen und wird aufgrund der zunehmenden Spannung und Belastung der Makrophagen bei ihrer Differenzierung vermehrt synthetisiert. Auch durch Inkubation von Monozyten mit PMA konnte eine gesteigerte Vimentin-Produktion nachgewiesen werden.⁸ Die Antikörperfärbung für Vimentin brachte zwei Banden hervor, eine obere bei 55 kDa und eine untere bei 47 kDa, wobei die obere Bande wahrscheinlich dem eigentlichen Ziel-Protein mit einer Molekülmasse von 58 kDa und die untere der unspezifischen Bindung an ein verwandtes Protein entspricht. Besonders das Signal der oberen Bande bei 55 kDa wurde mit zunehmender Rotationszeit schwächer und bei Stimulation der Zellen mit PMA stärker. In der Quantifizierung konnten in der oberen, nicht jedoch in der unteren Bande signifikante Unterschiede festgestellt werden. Durch die Stimulation der Zellen mit PMA kam es zu einer signifikanten Expressionszunahme von Vimentin, in der μ g-Gruppe, wie auch in den Kontrollen. Dies ist wahrscheinlich auf die Transkriptionssteigerung des Vimentin-Gens bei Proliferation und Differenzierung entlang des monozytären Weges zurückzuführen.

Mit steigender Experimentzeit kam es bei der Klinorotation unstimulierter Zellen zu einer Expressionsabnahme von Vimentin. Signifikant war der Unterschied zwischen 24 und 72 Stunden Klinorotation, sowohl in der μ g-Gruppe, als auch in den Kontrollen. Eine mögliche Ursache hierfür ist eine beginnende Substrat-Minderversorgung der Zellen mit steigender Experimentzeit. Da Vimentin auch ein proliferationsabhängiges Gen ist, ist auch ein Zusammenhang mit einer verminderten Teilungsaktivität der Zellen denkbar.⁸

Die Vimentin-Expression war in den Zellen der μ g-Gruppen geringer als in jenen der 1g-Kontrollen, signifikant war dieser Unterschied nach 24 Stunden Experimentphase mit unstimulierten Zellen. Es könnte spekuliert werden, dass dieser Unterschied auch bei den anderen Experimentzeiten signifikant geworden wäre, wären mehr Experimente durchgeführt worden. Für diese mikrogravitationsinduzierte Expressionsabnahme kommen zwei Ursachen in Frage. Einerseits könnte die Verminderung der Schwerkraft einen direkten differenzierungshemmenden Effekt auf die monozytären Zellen haben. Vor dem Hintergrund der in früheren Studien festgestellten Einschränkung der Monozytenfunktion nach Raumfahrtmissionen

erscheint diese Theorie durchaus plausibel.^{21; 24; 25} Andererseits könnte auch ein rein mechanisches Phänomen für diesen Unterschied verantwortlich sein. Durch die Klinorotation der suspenten Zellen bewegen sich diese freier und sind so weniger mechanischen Belastungen ausgesetzt, als wenn sie wie die Zellen der 1g-Kontrollen am Boden der Röhrchen sedimentieren. Die geringere Vimentin-Synthese könnte somit auch Ausdruck einer rotationsbedingten Belastungsminderung sein.

Wie c-Jun ist auch c-Myc Bestandteil eines Transkriptionsfaktors und reguliert die Expression von Genen der Zellproliferation und –Differenzierung. Seine Wirkung erhält c-Myc durch die Heterodimerisierung mit Max. Reguliert werden Gene, welche E-Boxen, also bestimmte DNS-Sequenzen aufweisen.⁹ Aufgrund einer Diskrepanz zwischen den Genen, welche eine E-Box enthalten und jenen, welche experimentell als durch c-Myc reguliert identifiziert werden konnten, werden alternative Regulationsmechanismen diskutiert.^{9; 10} Ausserdem ist c-Myc ein Protoonkogen, das bei Überexpression zu einer De-Regulation des natürlichen Zellzyklus führt. Schlussendlich stimuliert c-Myc die Zellen auch zur Apoptose, durch Interaktion mit Bax, wie auch durch Stimulation von p19Arf.¹¹ Um eine Apoptose der Zellen zu verhindern, wird die c-Myc-Expression während der myeloischen Zelldifferenzierung inhibiert, c-Myc kann somit als inverser Marker für die Differenzierung genutzt werden.¹² In der Antikörperfärbung für c-Myc wurde eine deutliche Bande bei 60 kDa sichtbar. Die digitale Quantifizierung des Signals zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den µg-Gruppen und den 1g-Kontrollen. Signifikant war die Expressionsabnahme von c-Myc von 48 zu 72 Stunden Klinorotation bzw. Experimentphase unstimulierter Zellen, sowohl in den µg-Gruppen, als auch in den 1g-Kontrollen. Ursächlich hierfür kommt, ähnlich wie bei der Vimentin-Expression, eine beginnende Minderversorgung der Zellen nach längerer Exposition in Frage.

Durch die Stimulation der Zellen mit PMA kam es zu einer signifikanten Expressionszunahme von c-Myc, insbesondere in den Zellen der µg-Gruppen. Als inverser Differenzierungsmarker müsste c-Myc während der durch PMA induzierten myeloischen Zelldifferenzierung vermindert exprimiert werden.¹² Diese konträre Reaktion der c-Myc-Synthese könnte, wie bereits die Resultate der c-Jun- und Vimentin-Analysen, auf einen direkten, differenzierungshemmenden Effekt der simulierten Mikrogravitation zurückzuführen sein. Obschon die Experimenten-Zahl begrenzt war und die Vergleichbarkeit mit Daten von Raumfahrtmissionen kritisch zu betrachten ist, zeichnete sich für die drei untersuchten myeloischen

Differenzierungsmarker eine einheitliche Tendenz ab. Die mittels Klinorotation simulierte Mikrogravitation hemmt die durch PMA induzierte myeloische Zelldifferenzierung der monozytären Zellen der Tumorzelllinie U937.

Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Mechanismen des Einflusses der Schwerelosigkeit auf humane Monozyten und auf von ihnen abstammende Makrophagen genauer zu beleuchten. Zusammengefasst ergibt diese Arbeit eine höhere Zellzahl bei geringerer Zellvitalität nach Klinorotation sowie eine Hemmung der myeloischen Zelldifferenzierung. Vor dem Hintergrund der bestehenden Literatur unterstützt diese Arbeit die Hypothese einer mikrogravitationsinduzierten Hemmung des Monozyten-Makrophagen-Systems als Teil sowohl des innaten wie auch des adaptiven Immunsystems. Um die Regulationsmechanismen und die intrazellulären Signalwege, die der Stimulus der Schwerelosigkeit nimmt, wirklich zu verstehen, bedarf es allerdings weiterer Studien. Einen möglichen „Schwerkraft-Rezeptor“ der Zellen zu identifizieren, wäre ausgesprochen interessant, nicht nur für die Raumfahrt, sondern auch für die Biologie und die Medizin. Auch über das Ausmass der Hemmung des menschlichen Immunsystems durch die Schwerelosigkeit muss mehr in Erfahrung gebracht werden, bevor eine längere, bemannte Raumfahrtmission wie beispielsweise zum Mars in Betracht gezogen werden kann. Nur so kann für die Sicherheit und Gesundheit der Astronauten garantiert werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Pollard, K. M., & Kono, D. H. (2013). Requirements for innate immune pathways in environmentally induced autoimmunity. *BMC Med*, 11 - 100
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2004). *Molekularbiologie der Zelle*, 4. Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
3. Hashimoto, S.-i., Suzuki, T., Dong, H.-Y., Yamazaki, N., & Matsushima, K. (1. August 1999). Serial Analysis of Gene Expression in Human Monocytes and Macrophages. *Blood* , 94, S. 837-844.
4. Minafra, L., di Cara, G., Albanese, N. N., & Cancemi, P. (2011). Proteomic differentiation pattern in the U937 cell line. *Leukemia Research* (35), S. 226-236.
5. Raff, H. V., Picker, L. J., & Stobo, J. D. (September 1980). Macrophage heterogeneity in man. *The Journal of experimental Medicine* (152), S. 581-593.
6. Karin, M., Liu, Z.-g., & Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Current opinion on cell biology* (9), S. 240-246.
7. Angel, P., & Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochemica et Biophysica Acta* (1072), S. 129-157.
8. Rius, C., & Aller, P. (1992). Vimentin expression as a late event in the in vitro differentiation of human promonocytic cells. *Journal of cell science* , S. 395-401.

9. Eilers, M., & Eisenmann, R. N. (2008). Myc's broad reach. *Genes & development* , S. 2755-2766.

10. Amente, S., Lania, L., & Majello, B. (Februar 2011). Epigenic reprogramming of myc target genes. *American journal of cancer research* , S. 413-418.

11. Afanaseyeva, E. A., Komarova, E., Larsson, L.-G., Bahram, F., Margulis, B. A., & Guzhova, I. V. (2007). Drug-induced myc-mediated apoptosis of cancer cells is inhibited by stress protein hsp 70. *International journal of cancer* (121), S. 2615-2621.

12. Bartova, E., Kozubek, S., Kozubek, M., Jirsova, P., Lukasova, E., Skalnikova, M., et al. (2000). Nuclear topography of the c-myc gene in human leukemic cells. *Gene* (244), S. 1-11.

13. Garrelds, I. M., van Hal, P. T., Haakmat, R. C., Hoogsteden, H. C., Saxena, P. R., & Zijlstra, F. J. (1999). Time dependent production of cytokines and eicosanoids by human monocytic leukaemia U937 cells, effect of glucocorticoids. *Mediators of inflammation* (8), S. 229-235.

14. Deszo, E. L., Brake, D. K., Cengel, K. A., Kelley, K. W., & Freund, G. G. (Dezember 2000). CD45 negatively regulates monocytic cell differentiation by inhibiting phorbol 12-myristate 13-acetate-dependent activation and tyrosine phosphorylation of protein kinase c delta. *The journal of biological chemistry* , S. 10212-10217.

15. Matsumoto, E., Hatanaka, M., Bohgaki, M., & Maeda, S. (Juni 2006). PKC pathway and ERK/MAPK pathway are required for induction of cyclin D1 and p21 Waf1 during 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced differentiation of myeloleukemia cells. *Kobe journal of medical science* , S. 181-194.

16. Turner, R. T. (2000). Invited review: What do we know about the effect of spaceflight on bone? *Journal of applied physiology* (89), S. 840-847.
17. Bergmann, L., Schäfer, C., Dorfmueller, T., Hering, W., & Stierstadt, K. (1998). *Lehrbuch der Experimentalphysik* (Bd. 1). Walter de Gruyter GmbH & Co.
18. Rai, B., Kaur, J., & Catalina, M. (2010). Bone mineral density, bone mineral content, gingival crevicular fluid (matrix metalloproteinase, cathepsin K, osteocalcin) and salivary and serum osteocalcin levels in human mandible and alveolar bone under conditions of simulated microgravity. *Journal of oral science* (52), S. 385-390.
19. Kaur, I., Simons, E. R., Castro, V. A., Ott, M. C., & Pierson, D. L. (September 2004). Changes in neutrophil functions in astronauts. *Brain, behavior and immunity* (18), S. 443-450.
20. Konstantinova, I. V., Ryokova, M. P., Lesnyak, A. T., & Antropova, E. A. (September 1993). Immune changes during long-term mission. *Journal of leukocyte biology* (54), S. 189-201.
21. Kaur, I., Simons, E. R., Castro, V. A., Ott, M. C., & Pierson, D. L. (2005). Changes in monocyte functions of astronauts. *Brain, behavior and immunity* (19), S. 547-554.
22. Rosado, H., Stapleton, P. D., & Taylor, P. W. (Oktober 2006). Effect of simulated microgravity on the virulence properties of the opportunistic bacterial pathogen *Staphylococcus aureus*. 57th international astronautical congress.
23. Sonnenfeld, G. (Juni 2002). The immune system in space and microgravity. *Medicine & science in sports & exercise*, S. 2021-2027.

24. Meehan, R. T., Neale, L. S., Kraus, E. T., Stuart, C. A., Smith, M. L., Cintron, N. M., et al. (1992). Alteration in human mononuclear leucocytes following space flight. *Immunology* (76), S. 491-497.

25. Kaur, I., Simons, E. R., Kapadia, A. S., Ott, M. C., & Pierson, D. L. (Oktober 2008). Effect of spaceflight on ability of monocytes to respond to endotoxins of gram-negative bacteria. *Clinical and vaccine immunology* , S. 1523-1528.

26. DLR. (2012). Abgerufen am 5. April 2012 von Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt: www.dlr.de

27. NASA. Abgerufen am 10. April 2013 von NASA: www.nasa.gov

28. Gravitationsbiologie, A., & Bonn, U. (2007). Gravitationsbiologie - Forschung im Weltraum und auf der Erde. Abgerufen am 19. März 2011 von www.spacebio.uni-bonn.de

29. Paulsen, K. (2009). Western Blot Analyse. Zürich.

30. Ullrich, O., & Thiel, C. (2012). Gravitational Force: Triggered Stress in Cells of the Immune System. In *Stress Challenges and Immunity in Space* (S. 187 - 202).

31. Ullrich, O., Paulsen, K., Thiel, C., Timm, J., Peter, S., Huber, K., et al. (2010). Microgravity-induced alterations in Signal Transduction in Cells of the Immune System. *Acta Astronaut*, S. 1116 - 1125.

32. Ullrich, O., Thiel, C., Svantje, T., Paulsen, K., Götz, N., Simmet, D., et al. (2012). Function an Signal Transduction in cells of the innate Immune System in Microgravity - Results from coordinated Space and Parabolic flight Experiments. International Astronautical Federation.

33. Harper, B., Fine, D., Guckian, J., & Cavallo, T. (1981, Nr. 42). Trypan blue inhibition of complement receptor-function on various cells. *Immunology*, S. 61 - 66.

8. Danksagung

Ich möchte allen, die mir die Arbeit an meiner Dissertation ermöglichten und erleichterten, ganz herzlich danken:

- Prof. Dr. Dr. Oliver Ullrich
- Dana Simmet
- Dr. med. Katja Paulsen
- Dr. Kathrin Huber
- Miriam Christen
- Dr. Svantje Tauber
- Sonja Krammer

9. Curriculum Vitae

Laura Maria Roose von Zürich, ZH

| | |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| 17.05.1987 | Geboren in Zürich, ZH |
| 1993-1999 | Primarschule im Schulhaus Fluntern, Zürich |
| 1999-2005 | Realgymnasium Rämibühl Zürich (Englisch-Italienisch) |
| 2006 | Sprachaufenthalt Antibes Frankreich mit DELF B2 an der Universität von Cannes |
| 2006-2012 | Medizinstudium in Zürich |
| 2012 | Eidgenössisches Staatsexamen der Humanmedizin |
| 2013 - 2014 | Assistenzärztin der Inneren Medizin am Kantonsspital Münsterlingen |